

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**PAPEL DE INTERFASES Y RESIDUOS
INTERFÁSICOS EN LA ELASTICIDAD MECÁNICA
Y DINÁMICA CONFORMACIONAL DE PARTÍCULAS
DEL VIRUS DIMINUTO DEL RATÓN**

Pablo J. Pérez Carrillo

Madrid 2015

Memoria presentada por Pablo J. Pérez Carrillo para optar al grado de Doctor en Ciencias. Madrid 2015.

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM) bajo la dirección del Prof. Mauricio García Mateu, con una beca predoctoral FPI.

A mis padres y hermanos, que son mi corazón.

Agradecimientos

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin la colaboración de un gran número de personas que la han hecho posible. En primer lugar me gustaría agradecer a mi Director de Tesis, el Prof. Mauricio G. Mateu, por su paciencia y su buen hacer tanto científico como docente. Me has enseñado, con la paciencia y dedicación de un profesor comprometido, lo que significa ser un científico de verdad, riguroso y metódico. Muchas gracias.

También me gustaría agradecer a todos aquellos investigadores que han participado directa o indirectamente en esta tesis. Especialmente al Prof. José María Almendral, que proporcionó generosamente a nuestro grupo su colaboración, enorme experiencia sobre la biología del virus diminuto del ratón, y diversos materiales biológicos imprescindibles; y al Prof. Pedro J. de Pablo, que nos ha ayudado con su colaboración y como experto destacado en AFM y su aplicación al estudio de la mecánica de virus, y ha sido una constante fuente de información y soluciones técnicas.

Muchas gracias también a los Dres. Milagros Castellanos, Rebeca Pérez y Alejandro Valbuena y a las licenciadas Alicia Rodríguez-Huete y Marta Hervás de nuestro grupo, por su imprescindible colaboración y ayuda en algunos de los estudios realizados en esta Tesis.

Merche, Álvaro y Aida, habéis sido un gran apoyo para que un biólogo como yo sea capaz de usar un AFM.

A los que estuvieron en mis principios científicos: Domingo Marquina y Antonio. Ellos fueron los primeros en darme una oportunidad en la ciencia en el departamento de microbiología de la complutense, algo por lo que estaré siempre agradecido.

En nuestro laboratorio fueron muchas las personas que me ayudaron y guiaron. Mila, que me enseñó a trabajar en el laboratorio y casi todas las técnicas que he tenido que utilizar. Me alegro mucho de haberte tenido cerca y de poder llamarte amiga. El virus diminuto de ratón me cae un poco mejor gracias a ti. Ali, muchas gracias por toda tu ayuda, has hecho mi trabajo más fácil y mi tiempo en el laboratorio mucho más agradable. Alex, no podría haber hecho todas esas medidas con el aparato maldito (también llamado AFM) sin tu ayuda. Has conseguido que me lo haya pasado bien cacharreando con él. Las chicas de antes: Rebepé, Rebeca B y Vero, gracias por acogerme cuando llegué. Miguel Ángel, qué interesantes debates científicos. Las chicas de ahora: María y Silvia, que son fuente de alegría y buen rollo en el labo. Por último Marta, que estuvo poco pero ayudó mucho, fue un placer trabajar contigo. Espero que os vaya genial a todos.

Dentro del CBM también han sido muchos los que me ayudaron o hicieron más agradable estos años. Los encargados de cultivos, M^a Ángeles, Anuncia y Alfonso, qué fácil es trabajar con vosotros cerca. Buenas gentes del 121 (Ana, Isa y Celia) y del 105 (Angi, Flavia y Miguel), muchas gracias por esos ratos el cultivos. Maite y Mila de microscopía electrónica, gracias por vuestra paciencia y buen humor. Jorge, Parras y Stefano, buena gente donde la haya. Diego de informática. Todos los que me hayáis ayudado, por pequeña que fuera la tarea, muchísimas gracias.

No puedo olvidarme de mis otros labos y todos sus integrantes. El 208, que me han soportado casi tanto como el mío propio. Raquel, Ester, María y Vega, cuánto me alegro de haberos conocido. Patri, ya no te tiraré más de la rasta; Alberto y su pepinillo (tú ya me entiendes); Almuserdi, pequeña loca y compi de piscina, ya te echo de menos. Y el 204 o también llamadas “las Pachus”, compis de desayuno. Las que llegaron después: Irene, Ana y Ainoa; y l@s que ya estaban: Sandra, Celia, Alfonso y Lore, mi rubia preferida y compañera de biblioteca. Ha sido un gusto compartir mi estancia en el CBM con todos vosotros, puedo decir que he tenido tres laboratorios llenos de gente estupenda.

Mención especial en esta tesis merecen mis Master Amigos, sois un grupo de gente excepcional: Jero, compañero en todo tipo de tropelías, esperemos que vengan muchas más (los tiburones nos esperan). Pachus, compañera en la trinchera hasta el final, tu simpatía y cariño alegraron este último esfuerzo. Álvaro y Aran, dos de las mejores personas que he conocido. Carletes y Elia, mis modernos preferidos, no sé qué habría sido de mi sin vuestra generosidad. Ali, la de la sonrisa perpetua, que no falten las cañas. Fercho, el único tan payaso como yo, y Ram, compi de tribu. Ratus, cómo me he divertido contigo. Jambito, eres un máquina, si se te ocurre cambiar te crujo. Azu, ánimo que te queda poco. Chechu y Raquel se os echa de menos. Currete, deja de ser tan sano que de algo hay que morir. Dani, que me enseñó a hacer un mojito de verdad, no se te olvida.

Sobre todo estoy infinitamente agradecido a toda mi familia, porque todo lo bueno que hay en mi es gracias a vosotros. Mis abuelos, tíos y primos, pero sobre todo a mis padres, que son la viva imagen de la bondad, del amor y de la dedicación sin límites. Mi único objetivo en la vida es parecerme a vosotros y ser capaz de sacar adelante una familia como vosotros habéis hecho. Mis hermanos, Mewy, Panchi, Maca, Chicha y Javi. No me puedo imaginar una infancia más feliz y vida más divertida. Gracias.

A mi Bicho. Tu eres Madrid, y Nueva York y Chicago y París... Sabes que sin ti esta tesis no existiría. Gracias por tu apoyo y amor estos años, por entrar en mi vida. Gracias a ti soy alguien mejor. Me ha hecho muy feliz compartir esta parte del viaje contigo y espero que, sea cual sea el destino, hagamos juntos el resto del camino.

Índice

Índice de abreviaturas	1
Summary	3
1. Introducción	7
1.1. Ensamblaje y desensamblaje de partículas víricas	7
1.1.1. Intermediarios de ensamblaje y desensamblaje de cápsidas víricas	9
1.1.2. Estudios teóricos sobre el ensamblaje y desensamblaje de cápsidas víricas	11
1.2. Determinantes moleculares del ensamblaje, estabilidad y desensamblaje de partículas víricas	13
1.3. Dinámica conformacional de partículas víricas	16
1.4. Potencial electrostático en partículas víricas	18
1.4.1. Influencia de las fuerzas electrostáticas en el ensamblaje, desensamblaje y estabilidad de la cápsida	18
1.4.2. Influencia del potencial electrostático en el empaquetamiento del ácido nucleico en el virión	19
1.4.3. Influencia de las cargas eléctricas en la dinámica conformacional de los virus	20
1.5. Propiedades mecánicas de las partículas víricas	21
1.5.1. El microscopio de fuerzas atómicas	21
1.5.2. Determinantes moleculares de las propiedades mecánicas de los virus	27
1.6. El Virus Diminuto de Ratón (MVM)	29
1.6.1. Estructura de MVM	29
1.6.2. Ciclo biológico.	33
2. Objetivos	39
3. Materiales y Métodos	43

3.1. Células y virus	43
3.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> , cultivo y transformación	43
3.1.2. Células de insecto y su cultivo	45
3.1.3. Células de mamífero y su cultivo	45
3.1.4. Baculovirus, infección y titulación	45
3.1.5. Virus MVM, infección y titulación	46
3.2. Plásmidos recombinantes	47
3.2.1. Plásmido pSVtk-VP1/2	47
3.2.2. Plásmido pFB1-VP2	47
3.2.3. Bácmido BM-VP2	48
3.2.4. Plásmido pTRp	48
3.3. Mutagénesis dirigida	49
3.3.1. Procedimiento	49
3.3.2. Introducción de mutaciones racionales en el clon infeccioso pTRp	49
3.4. Obtención de baculovirus recombinantes, expresión de VP2 y producción de VLPs de MVM en células de insecto	51
3.4.1. Transfección de células H5 con el bácmido BM-VP2	51
3.4.2. Amplificación de baculovirus recombinantes	52
3.4.3. Purificación de VLPs producidas en células de insecto	52
3.5. Expresión de VPs y producción de cápsidas vacías y viriones de MVM en células de mamífero	53
3.5.1. Electroporación de células NB324K con los plásmidos pSVtk- VP1/2 o pTRp	53
3.5.2. Purificación a escala analítica de cápsidas vacías	54
3.5.3. Purificación a escala preparativa de viriones	55
3.6. Obtención de sueros policlonales contra VPs desnaturalizadas de MVM	56
3.7. Análisis de la expresión de VPs y ensamblaje de cápsidas de MVM mediante inmunofluorescencia <i>in situ</i>	56
3.8. Análisis mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos de transiciones Conformacionales y disociación de VLPs de MVM inducidas por calor	57
3.9. Cinéticas de inactivación térmica de viriones de MVM	58
3.10. SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de proteínas	58
3.10.1. SDS-PAGE analítica	58
3.10.2. SDS-PAGE preparativa	59

3.10.3. Inmunoelectrotransferencia	59
3.11. Determinación de actividad hemaglutinante de partículas de MVM	60
3.12. Microscopía electrónica (ME)	60
3.13. Microscopía de Fuerzas Atómicas	60
3.13.1. Preparación del soporte de vidrio	61
3.13.2. Preparación de la muestra	61
3.13.3. Calibración de la micropalanca	62
3.13.4. Obtención de imágenes de partículas víricas de MVM en medio líquido	62
3.13.5. Determinación de la rigidez mecánica de partículas de MVM en medio líquido	64
3.13.6. Análisis del desensamblaje mecánico de partículas de MVM en medio líquido	66
3.14. Visualización de estructuras moleculares, modelado molecular y cálculos estructurales	67
3.15. Cálculo, representación y análisis estadístico de datos	68
4. Resultados	71
4.1. Papel funcional de residuos cargados en la cara interna de la cápsida	71
4.1.1. Análisis del número y distribución de grupos cargados en la cara interna de la cápsida de MVM.	71
4.1.2. Diseño racional de mutaciones para el análisis estructura-función de grupos cargados y su distribución en la pared interna de la cápsida	74
4.1.3. Análisis de efectos funcionales de mutaciones que cambian el número y Distribución de grupos cargados en la pared interna de la cápsida	77
4.1.4. Bases estructurales de la importancia funcional de anillos de residuos ácidos internos localizados alrededor de los poros en la cápsida	82
4.2. Desensamblaje mecánico de MVM e intermediarios de desensamblaje	85
4.2.1. Desensamblaje mecánico de la cápsida	86
4.2.2. Energía disipada durante la disociación mecánica de subunidades de la cápsida	92
4.2.3. Desensamblaje mecánico de viriones	93
4.3. Relación entre rigidez mecánica local y resistencia a	

la inactivación térmica del virión de MVM	94
4.3.1. La eliminación de diferentes interacciones entre la cápsida y el ADN en el virión de MVM reduce en un grado diferente la resistencia mecánica local del virus	94
4.3.2. Relación exponencial entre resistencia a inactivación térmica del virión de MVM y rigidez mecánica local debida a interacciones cápsida-ADN	98
4.3.3. Los aumentos de rigidez provocados por el establecimiento de interacciones cápsida-ADN o el rellenado de cavidades no son aditivos	101
4.3.4. Las reducciones de la rigidez local y la resistencia a la inactivación por calor provocadas por la eliminación de interacciones cápsida-ADN pueden ser compensadas por las mutaciones de rellenado de cavidades	102
4.4. Estudio de determinantes moleculares de las propiedades mecánicas de la cápsida de MVM	104
4.4.1. Elección de mutaciones para investigar el papel de residuos e interacciones intersubunidad en la rigidez mecánica de la cápsida de MVM	104
4.4.2. Efecto de la eliminación de cadenas laterales e interacciones intersubunidad sobre la rigidez mecánica de la cápsida de MVM	108
4.4.3. Efectos de la combinación de mutaciones en interfases entre subunidades sobre la rigidez mecánica de la cápsida de MVM	116
5. <u>Discusión</u>	<u>121</u>
5.1. Distribución de carga en la pared interna de la cápsida y dinámica conformacional en MVM	121
5.2. Intermediarios en la ruta de (des)ensamblaje de MVM	124
5.3. Determinantes moleculares de propiedades mecánicas de MVM, e implicaciones biológicas	127
6. <u>Conclusiones</u>	<u>141</u>
7. <u>Bibliografía</u>	<u>145</u>

Índice de abreviaturas

aa: aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFM: Microscopio/Microscopía de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscope/Microscopy*)

ARN: Ácido ribonucleico

BMV: Virus del mosaico del bromo (*Brome Mosaic Virus*)

BSA: Seroalbúmina bovina (*bovine serum albumin*)

CCMV: Virus del moteado clorótico del caupí (*Cowpea Chlorotic Mottle Virus*)

CM: Modo de contacto (*contact mode*)

CPV: Parvovirus canino (*Canine Parvovirus*)

cs: Cadena simple

DEAE: dietilaminoetilo

DMSO: dimetilsulfóxido

DMEM: medio de cultivo Eagle, modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

dpi: Días post infección

cd: Cadena doble

ecp: Efecto citopático

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

F_{adh}: Fuerza de adhesión

F_{ap}: Fuerza aplicada

FMDV: Virus de la fiebre aftosa (*Foot-and-mouth disease virus*).

FPV: Parvovirus felino (*Feline Parvovirus*)

Fz: Fuerza-distancia

HA: Hemaglutinación

HBV: Virus de la hepatitis B (*Hepatitis B virus*)

HCV: Virus de la hepatitis C (*Hepatitis C virus*)

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HMDS: Hexametildisilazano

hpe: Horas post-electroporación

HRV: Rinovirus humano (*Human Rhinovirus*).

HSV-1: Virus herpes simple tipo 1 (*Herpes Virus Simplex 1*).

IF: Inmunofluorescencia

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

JM: Modo de salto (*jumping mode*)
 k_c : Constante elástica de la micropalanca
 k_{in} : Constante de velocidad de inactivación térmica
 k_s : Constante elástica de la muestra
LB: Luria-Bertani
mdi: Multiplicidad de infección
MD: Dinámica Molecular (*Molecular Dynamics*).
ME: Microscopio electrónico/Microscopía electrónica
MVM: Virus diminuto del ratón (*Minute Virus of Mice*).
MVMI: Cepa inmunosupresora de MVM.
MVMP: Cepa prototipo de MVM.
MVL: virus de la leucemia murino (*Murine Leukemia Virus*).
NC: Nitrocelulosa
Nt: Extremo amino-terminal
PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)
PBSc: PBS completo
PDB: banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*)
 OD_{600} : Densidad óptica a 600 nm
rpm: Revoluciones por minuto
S2/S3/S5: ejes de simetría binaria, ternaria o quíntica de una partícula vírica
SF: Suero fetal bovino
SPM: Microscopía de sonda de barrido (*Scanning Probe Microscope*)
SDS: dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
STMV : virus satélite del mosaico del tabaco (*Satellite Tobacco Mosaic Virus*)
SV40: Virus 40 vacuolado del simio (*Simian Virus 40*)
t.a: Temperatura ambiente
TE: Tampón Tris + EDTA
TMV: Virus del Mosaico del Tabaco (*Tobacco Mosaic Virus*)
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
ufp: Unidad formadora de placas
u.a.: Unidades arbitrarias
VLP: Partícula semejante a Virus (*Viral-Like Particles*)
VP 1/2/3 : Proteína Viral 1 / 2 / 3 (*Viral protein 1 / 2 / 3*)
 λ_{exc} : Longitud de onda de excitación
 λ_{em} : Longitud de onda de emisión

Summary

In this study we have carried out systematic analyses using different techniques, including protein engineering and atomic force microscopy (AFM), to provide new insights into the role of protein-protein or protein-nucleic acid interfaces, interfacial residues and interactions into assembly/disassembly, mechanical stability and conformational dynamics of a simple model icosahedral virus, the minute virus of mice (MVM).

In the first part of this study we carried out a systematic mutational analysis to investigate the role of electrically charged residues at the inner capsid wall (the interface between capsid and viral nucleic acid) in assembly, dynamics and infectivity of MVM. The results revealed that the presence and distribution of those residues is not generally relevant for assembly or infectivity; however, rings of negatively charged residues around the capsid pores are critical for preserving the pore-associated capsid dynamics and for virus infectivity.

In the second part of this study we subjected single capsids and virions of MVM to mechanical disassembly using AFM, in order to probe the disruption of intersubunit interfaces and identify intermediates in the (dis)assembly pathway. The results allowed us to experimentally confirm the existence of a series of transient intermediaries that had been theoretically predicted using different approaches. These include: i) capsids missing one capsomer (trimer of capsid subunits); ii) capsids missing one pentamer of capsomers; and iii) pentamers of capsomers.

In the third part of this study, we carried out a systematic mutational analysis of the localized interfaces between viral DNA segments and DNA-binding sites in the capsid inner wall, to investigate the relationship between local mechanical elasticity and propensity for thermal inactivation of the MVM virion. The results revealed a quantitative relationship between a decrease in mechanical stiffness of capsid regions where some interactions with bound DNA segments are disrupted by mutation, and an increase in the propensity of the virion to undergo a heat-mediated structural change that inactivates its infectivity. Application of transition state theory indicated that there exists a linear relationship between mechanical stiffness in a region of a virion, and the energetic barrier of a structural transition in which that region is involved.

In the fourth and last part of this study we carried out a systematic mutational analysis of the intersubunit (intertrimer) interfaces in the MVM capsid to investigate by AFM the role of interfacial residues and intersubunit interactions in the mechanical elasticity of the viral particle. The results showed that residues generally located in elements of secondary structure and placed along the major lines that define the intertrimer interfaces exert an important role in maintaining the mechanical elasticity of the capsid. Removal of those interfacial residues almost invariably caused substantial increases in mechanical stiffness. The MVM capsid appears to have evolved towards a maximum of mechanical elasticity.

Taken together, the results of this study have provided further insights into the molecular determinants of the properties and functions of simple virus particles. In particular, this work represents a significant advance in the understanding of the molecular determinants of mechanical stiffness in viruses, the relationship between virus elasticity and conformational dynamics, and some biological implications of virus mechanics.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Actualmente existen tres enfoques principales en el estudio de los virus: i) el estudio desde un punto de vista básico o como modelos biológicos sencillos, lo cual aporta un conocimiento fundamental sobre su biología y, además, ha liderado en muchos casos el avance en el conocimiento de los principios generales de la Biología. ii) el estudio para el desarrollo de terapias antivirales. El hecho de que los virus utilicen la maquinaria celular del hospedador dificulta en gran medida el desarrollo de fármacos para luchar contra las infecciones víricas. iii) el estudio con fines biotecnológicos. En este vasto campo se pueden englobar todas aquellas investigaciones que usan a los virus o alguna de sus partes para el desarrollo de, entre otras, aplicaciones tecnológicas, biomédicas o nuevos biomateriales (Douglas y Young, 2006; Nam *et al.*, 2006; Bittner *et al.*, 2013; Kotterman y Schaffer, 2014).

En nuestra opinión, estudios centrados en aspectos como el ensamblaje y desensamblaje de los virus (Zlotnick y Fane, 2011; Almendral, 2013; San Martín, 2013), su estabilidad y dinámica conformacionales (Bothner y Hilmer, 2011; Mateu, 2013a), o sus propiedades físicas (de Pablo y Mateu, 2013) son relevantes desde la perspectiva de cada uno de los tres enfoques mencionados: i) pueden arrojar luz sobre aspectos poco conocidos del ciclo viral y de procesos biológicos en general; ii) contribuir al desarrollo de tratamientos antivirales; iii) y/o generar nuevos desarrollos biotecnológicos basados en la utilización de partículas víricas. El trabajo presentado en esta memoria pretende realizar algunas aportaciones a estos campos de estudio.

A continuación se introducen algunos antecedentes relevantes sobre etapas del ciclo vírico y propiedades físicas de los virus que han sido objeto de estudio en esta tesis.

1.1. Ensamblaje y desensamblaje de partículas víricas

El ensamblaje de una partícula vírica es, en esencia, un complejo proceso de oligomerización definido por las interacciones entre las macromoléculas participantes. En general, este proceso suele seguir una de tres estrategias: i) autoensamblaje de la cápsida sin participación directa de otros elementos estructurales, ii) ensamblaje asistido por proteínas de andamiaje, o iii) ensamblaje asistido por el ácido nucleico vírico (Chiu *et al.*, 1997; Agbandje-McKenna y McKenna, 2011; Mateu, 2013a y 2013b).

Las cápsidas víricas más sencillas presentan simetría helicoidal. Sin embargo, este tipo de cápsidas no es el más frecuente en la naturaleza, estando presente en

aproximadamente el 10 % de las familias de virus (Mateu, 2013b). Una cápsida helicoidal cuyo ensamblaje ha sido muy bien estudiado es la del virus del mosaico del tabaco (TMV). En esencia, la cápsida de TMV se ensambla a partir de discos formados por aproximadamente 38 copias de la proteína de la cápsida, que se condensan en torno al ácido ribonucleico (ARN) vírico de cadena sencilla (cs) (Culver, 2002; Clare y Orlova, 2010).

Por otra parte, las cápsidas icosaédricas son muy abundantes, estando presentes en aproximadamente la mitad de familias de virus y en la mayoría de los virus animales (Mateu, 2013b). Existe una diversidad muy notable en las arquitecturas y mecanismos de ensamblaje de este tipo de cápsidas. Dentro de este grupo encontramos casos de ensamblaje tan sencillos como el del virus diminuto de ratón (MVM), cuya cápsida de número de triangulación $T=1$ autoensambla a partir de 60 subunidades proteicas que presentan un plegamiento idéntico (Agbandje-McKenna et al., 1998); y casos tan complejos como adenovirus, con una cápsida de mucho mayor tamaño y número de triangulación *pseudo* $T=25$, compuesta de muchas subunidades de varias proteínas distintas, que presenta un proceso de ensamblaje asistido en varias etapas, seguido de una etapa de maduración (San Martín, 2012 y 2013).

Durante el ciclo biológico de muchos, aunque no todos los virus, la cápsida debe desensamblarse para liberar el material genético. Algunos virus, como los bacteriófagos con cola, inyectan el ácido nucleico genómico y no necesitan desensamblarse; otros virus, en cambio, han desarrollado cápsidas metaestables que se desestabilizan a través de procesos controlados para la desencapsidación del genoma (Veesler y Johnson, 2012; Domitrovic et al., 2013). El proceso de desensamblaje ha sido estudiado para diversos virus. Por ejemplo el virus de la fiebre aftosa (FMDV), tiene una fuerte tendencia a desensamblarse a pentámeros, lo que ocurre en la célula en el entorno ácido de los endosomas (Carrillo et al., 1985; Vazquez-Calvo et al., 2012); en el laboratorio este proceso puede igualmente dispararse cuando se comunica energía de otros modos, por ejemplo mediante presión hidrostática (Oliveira et al., 1999) o calor (Meloan et al., 1979; Mateo et al., 2008; Rincon et al., 2014). Adenovirus, sigue un complejo proceso de desensamblaje que empieza en el exterior celular y termina en el poro nuclear (apartado 1.1.1); Poliovirus se desensambla parcialmente y desencapsida mediante un cambio conformacional inducido por la unión del virus al receptor celular, que se puede mimetizar mediante calentamiento moderado (Chow et al., 1997).

1.1.1. Intermediarios de ensamblaje y desensamblaje de cápsidas víricas

Una parte fundamental en la comprensión del ensamblaje y desensamblaje de partículas víricas es la caracterización de la ruta de (des)ensamblaje de la cápsida, y de los intermediarios a través de los que transcurre dicha ruta. A este respecto se han hecho avances importantes en el conocimiento del (des)ensamblaje de algunos virus complejos mediante la identificación experimental de intermediarios, gracias a su suficiente estabilidad intrínseca, y/o a la incapacidad para ensamblar cápsidas completas en determinadas condiciones, conseguidas mediante métodos bioquímicos o genéticos (Fane y Prevelige, 2003; Steven et al., 2005). Dos ejemplos son el bacteriófago HK97 y el cianófago Syn5. En HK97 se han podido identificar tres intermediarios transitorios de ensamblaje durante el proceso de maduración, utilizando criomicroscopía electrónica y cristalografía de rayos X (Lata et al., 2000). En Syn5 se han podido identificar hasta cinco intermediarios de ensamblaje directamente dentro de la célula, usando criotomografía electrónica (Dai et al., 2013). En el caso de otros virus complejos se han podido identificar intermediarios cinéticos que ocurren de modo muy breve, no poblados en el equilibrio, utilizando técnicas como microscopía electrónica (García-Doval et al., 2013), espectroscopía de masas con ionización por electrospray (Morton et al., 2008) o criotomografía electrónica (Grunewald et al., 2003; Caston, 2013). Por desgracia, los complicados procesos de ensamblaje y maduración que generalmente sufren estos virus dificultan una comprensión más fundamental de la morfogénesis vírica mediante estudios con modelos teóricos y su comparación con los resultados experimentales.

El desensamblaje de la cápsida también se ha estudiado con algún detalle para el caso de virus complejos como adenovirus y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). El caso de adenovirus ha sido bien estudiado y se tienen datos obtenidos tanto por técnicas “en masa” (*bulk*) como por técnicas de partícula única (*single particle*). Gracias a la primeras se sabe que el desensamblaje ocurre de forma secuencial (Greber et al., 1993), empezando por la pérdida de las fibras de la cápsida en el exterior de la célula (Nakano et al., 2000), continuando en los endosomas, donde se pierden en primer lugar los pentones localizados en los vértices de la cápsida así como otros componentes cercanos a éstos (Wiethoff et al., 2005; Puntener et al., 2011; Perez-Berna et al., 2012) y luego en el poro nuclear donde la partícula completa su desensamblaje (Greber et al., 1997). Este proceso secuencial de desensamblaje se confirmó en experimentos de partícula única utilizando un microscopio de fuerzas atómicas (AFM) (Ortega-Esteban et al., 2013), que revelaron

además una menor resistencia al desensamblaje de las partículas maduras frente a las inmaduras (Perez-Berna et al., 2012). Para el desensamblaje de la cápsida de HIV, una vez internalizada en la célula, se ha propuesto un proceso secuencial mediado por factores celulares (Pawlica y Berthoux, 2014), que probablemente comience con la pérdida de algún componente de la cápsida, desencadenando el resto del desensamblaje (Ambrose y Aiken, 2014).

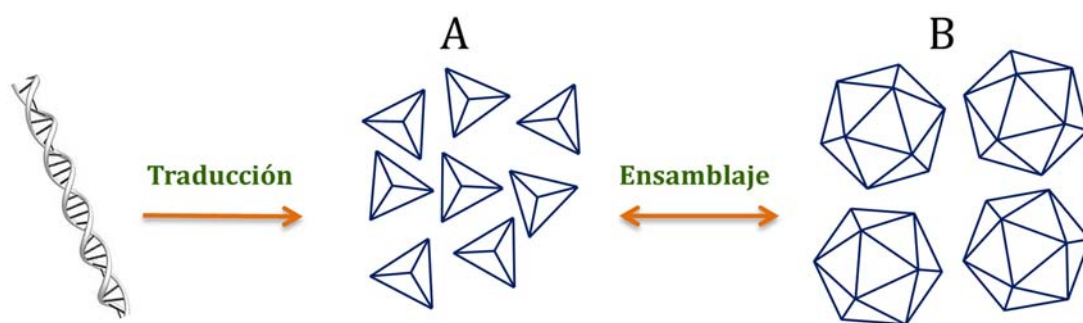


Figura 1: Esquema de ensamblaje en dos estados observado para cápsidas de virus icosaédricos sencillos. A) Se sintetizan elementos estables de ensamblaje (*building blocks*), que suelen ser oligómeros pequeños de la proteína de la cápsida, como dímeros o (en este ejemplo) trímeros. **B)** Estos elementos se asocian entre sí en cápsidas completas, sin acumulación apreciable de intermediarios en el equilibrio.

En unos pocos virus sencillos también se han detectado algunos intermediarios de ensamblaje o desensamblaje. Por ejemplo, en el caso del FMDV se sabe que el ensamblaje de la cápsida implica la unión de 3 proteínas estructurales distintas (VP0, VP1 y VP3) para formar un protómero, 5 protómeros se unen dando lugar a un pentámero, y 12 pentámeros se asocian para formar la cápsida (Rueckert, 1996; Rincon, 2012). Durante el desensamblaje, la cápsida se disocia a pentámeros, que son muy estables (ver apartado anterior). Muy recientemente, se han detectado mediante espectrometría de masas algunos intermediarios tardíos de ensamblaje de la cápsida del virus de la hepatitis B (HBV), que parecen ser cápsidas casi completas a los que les faltan unas pocas subunidades (Pierson et al., 2014). Sin embargo, en la gran mayoría de los estudios experimentales *in vitro* sobre el (des)ensamblaje de cápsidas y virus sencillos se han encontrado procesos en dos estados, en los que únicamente se observan los elementos iniciales de ensamblaje (*building blocks*) y partículas completas (Figura 1), pero ningún otro intermediario de ensamblaje estable (Zhou y Standring, 1992; Ceres y Zlotnick, 2002; Singh y Zlotnick, 2003; Riobobos et al., 2006; Uetrecht et al., 2008; Flint et al., 2009; Almendral, 2013; Reguera, 2013; Rincon et al., 2014).

1.1.2. Estudios teóricos sobre el ensamblaje y desensamblaje de cápsidas víricas

Desde hace algún tiempo se vienen desarrollando con frecuencia creciente estudios teóricos sobre el (des)ensamblaje de virus icosaédricos sencillos que, a diferencia de virus más complejos, pueden ser modelados adecuadamente (Phelps et al., 2000; Singh y Zlotnick, 2003; Zandi et al., 2004; Zlotnick, 2005; Devkota et al., 2009; Luque y Reguera, 2010; Moisant et al., 2010; Rapaport, 2010; Luque et al., 2012; Reguera, 2013). El problema con estos virus sencillos radica en que, como se ha comentado en el apartado anterior, la mayoría de intermediarios de ensamblaje son transitorios y difícilmente identificables experimentalmente, por lo que resulta complicado validar experimentalmente las predicciones realizadas en estudios teóricos.

Se resumen a continuación algunos estudios teóricos y simulaciones *in silico* realizadas con modelos de cápsidas (sin material genético) de virus icosaédricos sencillos que han permitido realizar predicciones sobre rutas e intermediarios cinéticos de ensamblaje y/o desensamblaje. Utilizando un modelo de ensamblaje icosaédrico con 60 subunidades Chadler y Hagan encontraron que la estructura más abundante durante los orígenes del ensamblaje es un trímero de monómeros (Hagan y Chandler, 2006), como el identificado experimentalmente en el parvovirus MVM (Riolobos et al., 2006), aunque este trímero se debe considerar el oligómero estable desde el que se inicia el ensamblaje, y no un intermediario transitorio. Zlotnick y colaboradores encontraron que durante las primeras fases del desensamblaje de HBV se acumulan cápsidas incompletas (especialmente aquellas a las que les falta sólo un capsómero) (Moisant et al., 2010) creando una barrera energética que dificulta el progreso de la disociación. Dichas cápsidas incompletas se pueden considerar trampas cinéticas, siendo más rápidas a la hora de reasociar un capsómero que en perder capsómeros adicionales (Singh y Zlotnick, 2003). Estos estudios teóricos se realizaron asumiendo una baja energía de asociación entre los capsómeros, porque favorece la formación de cápsidas completas frente a la formación agregados aberrantes de capsómeros incompletos (Zlotnick y Mukhopadhyay, 2011). Estos autores concluyeron que estas cápsidas termodinámicamente débiles son estabilizadas cinéticamente (Singh y Zlotnick, 2003).

Por otra parte, Rapaport llevó a cabo simulaciones de dinámica molecular (MD) “de grano grueso” (*coarse-grained*) con un modelo basado en una cápsida icosaédrica T=1 genérica que ensambla a partir de 20 capsómeros iguales (similar al ensamblaje real de la cápsida de MVM a partir de trímeros estables) (Rapaport, 2008 y 2010). En dichas

simulaciones encontró que los intermediarios con mayor vida media eran las cápsidas casi completas (especialmente aquellas carentes de un único capsómero), seguidos de los pentámeros de capsómeros. Además encontró que la energía de asociación entre capsómeros es fundamental para un correcto ensamblaje de cápsidas enteras. Si dicha energía es demasiado baja no ocurre el ensamblaje efectivo de cápsidas, mientras que si es demasiado elevada los capsómeros agregan demasiado rápido, formando estructuras incompletas que acaparan todos los capsómeros disponibles y, en consecuencia, impiden el ensamblaje de cápsidas enteras. A esta misma conclusión ha llegado diversos autores, tanto mediante estudios *in vitro* como mediante de cálculos teóricos o simulaciones *in silico* (Ceres y Zlotnick, 2002; Singh y Zlotnick, 2003; Johnson et al., 2005; Chen et al., 2008). Los autores resaltan además la importancia biológica de este tipo de interacciones poco energéticas como parte fundamental del ensamblaje de los virus, indicando que podrían facilitar procesos tan importantes como la respiración viral (*viral breathing*) o el desensamblaje de la cápsida para la liberación del genoma. Además, cabe mencionar que los fagos, que no necesitan desensamblar su cápsida para liberar el genoma, muchas veces refuerzan la misma mediante procesos de maduración que aumentan el número de interacciones entre subunidades (Domitrovic et al., 2013; Reguera, 2013).

Como otro ejemplo, Reddy y colaboradores calcularon posibles rutas de ensamblaje de diversas cápsidas víricas sencillas a partir de las energías de asociación entre subunidades de la cápsida (Reddy et al., 1998). Para parvovirus (como lo es MVM) encontraron una preferencia por la formación de cápsidas incompletas compuestas por 45 subunidades, es decir, carentes de un pentámero de capsómeros, sugiriendo que este podría ser un intermediario tardío en el ensamblaje de estos virus (Reddy y Johnson, 2005).

Diversos autores proponen, basándose en estudios teóricos, que el ensamblaje de cápsidas víricas implica un proceso de nucleación, con algún tipo de pequeño oligómero (dímero, trímero o pentámero de subunidades) como núcleo sobre el que el ensamblaje procede mediante un proceso de acreción, aunque diferentes aspectos del proceso varían según los autores (Zlotnick et al., 2000; Chen et al., 2008; Zandi et al., 2006; Luque, 2011; Reguera, 2013). Cabe mencionar como un ejemplo un trabajo de Brooks y colaboradores en el que, utilizando modelos de grano grueso y MD, comprobaron la importancia de la fase de nucleación y, además, explicaron desde un punto de vista geométrico la mayor vida media de las cápsidas casi completas a las que solo les falta un capsómero (Nguyen et al., 2009). Para ello proponen que la propia geometría del capsómero que ha de

introducirse en el último hueco de la cápsida supone un impedimento estérico que el proceso debe salvar, y que es el causante del retraso en el ensamblaje.

1.2. Determinantes moleculares del ensamblaje, estabilidad y desensamblaje de partículas víricas

La gran cantidad de modelos estructurales de virus obtenidos a elevada resolución y disponibles hoy en día en el banco de datos de proteínas (PDB) ha permitido un enorme avance en el conocimiento de su arquitectura, especialmente en el caso de virus esféricos sin envuelta. Este conocimiento ha permitido a su vez la realización de diferentes estudios mutacionales para investigar algunos determinantes moleculares del reconocimiento molecular entre subunidades de la cápsida, y del ensamblaje, estabilidad conformacional y/o desensamblaje de partículas víricas.

Se citan a continuación, a modo de muestra, algunos de los estudios que arrojaron luz sobre distintos aspectos del reconocimiento entre subunidades de cápsidas víricas. Foguel y colaboradores (Foguel et al., 1995) demostraron la importancia de la estabilización entrópica en el bacteriófago P22 analizando algunos residuos de las interfases entre subunidades de la cápsida. Utilizando el virus de la lengua azul, Limn y colaboradores (Limn et al., 2000) analizaron el efecto de algunas mutaciones interfásicas sobre la capacidad para la formación de capsómeros y la estabilidad de la partícula vírica. En los bacteriófagos MS2 (Stonehouse et al., 1996a; Stonehouse et al., 1996b) y fr (Axblom et al., 1998) se observó una disminución de estabilidad cuando se eliminaron ciertas interacciones entre subunidades de la cápsida. En el virus del enanismo amarillo de la cebada, Gray y colaboradores sugieren un papel fundamental para el ensamblaje y estabilidad de la cápsida de acetilaciones en ciertas lisinas presentes en una interfase, las cuales favorecerían la formación de puentes salinos que estabilizarían la cápsida (Cilia et al., 2014).

HBV ha sido estudiado profusamente por el grupo de Zlotnick y sus colaboradores (Zlotnick y Fane, 2011) gracias a lo cual se sabe que en dicho virus el ensamblaje de la cápsida está dirigido principalmente por interacciones hidrofóbicas en las interfases interdímeros, en las que aproximadamente el 75% del área enterrada es hidrofóbica (Bourne et al., 2006), y que la modificación de dichas interfases afecta a distintos aspectos de la biología del virus y no solo al ensamblaje de la cápsida (Tan et al., 2015). Además también han comprobado que ciertos compuestos que reducen la infectividad de HVB lo hacen aumentando la cinética de ensamblaje de la cápsida, para lo cual se introducen en

un bolsillo hidrofóbico existente en la interfase interdímeros de la cápsida, y que este efecto se puede mimetizar realizando una mutación de rellenado de dicha cavidad V124W (Tan et al., 2013). Existen muchas observaciones similares a éstas, obtenidas mediante un número bastante limitado de mutaciones, para muchos virus distintos.

En algunos laboratorios se han realizado estudios más completos sobre determinantes moleculares de estabilidad, ensamblaje y/o desensamblaje de algunas cápsidas víricas, mediante mutación sistemática de residuos individuales a alanina. Este método de “alanine scanning” (Wells, 1991) es aceptado como el que menos perturbaciones indeseadas introduce a la hora de analizar los efectos estructurales y funcionales de interacciones moleculares entre la cadena lateral del residuo mutagenizado con el resto de la estructura proteica o complejo molecular estudiado. Esta aproximación ha sido utilizada, por ejemplo, para estudiar el papel funcional de muchos residuos de la cápsida del virus de la hepatitis C (HCV) (Murray et al., 2007) o de HIV (von Schwedler et al., 2003; Sundquist y Krausslich, 2012). En HIV, Sundquist y colaboradores identificaron residuos de la cápsida madura implicados en el ensamblaje de la cápsida e infectividad del virión y localizados en alguna de las tres diferentes interfases de reconocimiento entre subunidades. En nuestro laboratorio hemos hecho uso abundante de ésta metodología para diseccionar el papel estructural y funcional de residuos individuales situados en interfases entre subunidades de la cápsida en tres virus modelo distintos: HIV, FMDV y MVM.

En el caso de HIV realizamos una disección termodinámica completa de una de las tres interfases principales entre subunidades de la cápsida madura, la interfase de homodimerización de la proteína CA. Esta interfase resultó una típica interfase proteína-proteína, pero con la particularidad de que su baja afinidad se debe a la presencia de residuos conservados que disminuyen la energía de interacción, en algún caso mediante el establecimiento de repulsiones electrostáticas (del Alamo et al., 2003; del Alamo et al., 2005).

En el virión de FMDV analizamos el papel funcional de cada cadena lateral en la interfase entre subunidades pentaméricas. Encontramos que la gran mayoría de estas cadenas laterales son individualmente muy importantes para la infectividad del virión (Mateo et al., 2003). Cabe destacar además que, al igual que ocurre en HIV, existen repulsiones electrostáticas entre subunidades de la cápsida, incluso a pH neutro, que cuando son eliminadas provocan un aumento de la estabilidad de la partícula (Rincon et al., 2014).

En el caso de MVM, hemos analizado sistemáticamente el papel en el ensamblaje, estabilidad y/o dinámica conformacional de la cápsida y la infectividad del virión de residuos de la cápsida implicados en la mayoría de interacciones entre subunidades de la misma. Estos residuos se encuentran localizados bien en interfases entre trímeros de subunidades (que como ya se ha mencionado, constituyen los elementos estructurales estables a partir de los cuales se ensambla la cápsida); o bien en las interfases entre las tres subunidades de la cápsida que forman cada trímero estable. En el caso de las interfases intertriméricas, se encontró que los pocos residuos que entierran en la interfase grupos hidrofóbicos grandes, puentes de hidrógeno o puentes salinos resultan indispensables para el ensamblaje de la partícula. En cambio, la gran mayoría de residuos en estas interfases no afectaron el ensamblaje ni la estabilidad de la cápsida (Reguera et al., 2004). No obstante, algunos de estos residuos, situados alrededor de la base de cada poro de la cápsida, resultaron críticos para la infectividad del virión al impedir un cambio conformacional de la cápsida, asociado a la extrusión de extremos N-terminales (Nt) de la proteína VP2 de la cápsida (Carreira et al., 2004; Reguera et al., 2004). En el caso de las interfases intratrímeros se encontró que casi todos los residuos ensayados son individualmente prescindibles para la formación de trímeros. Sin embargo, muchos de ellos resultaron estar implicados en un cambio conformacional del trímero (Riolobos et al., 2006) que lo hace competente para el ensamblaje (Perez et al., 2011).

Podemos concluir que los determinantes moleculares del ensamblaje y estabilidad de cápsidas víricas resultan ser muy variables. En algunos casos un número muy limitado de interacciones no covalentes, pero altamente energéticas, regulan de forma crítica el ensamblaje de la cápsida. En otros casos, un número mucho mayor de interacciones débiles dan cuenta del ensamblaje y la estabilidad de la cápsida. Todo ello parece indicar que la estructuración de estas interfases es el resultado de un complejo proceso evolutivo en respuesta a los requisitos contradictorios generados por la necesidad de una estabilidad y un dinamismo conformacional suficientes (ver apartado siguiente). Un mejor conocimiento de los procesos de ensamblaje estabilidad y desensamblaje de las partículas víricas, y de sus determinantes moleculares, puede ayudar a comprender mejor aspectos poco conocidos del ciclo vírico, y también a desarrollar fármacos antivirales que interfieran con alguno de éstos procesos (Neira, 2009; Prevelige, 2011; Zlotnick y Mukhopadhyay, 2011; Menéndez-Arias, 2013), y al desarrollo de nanopartículas para fines biomédicos o nanotecnológicos (Liu et al., 2012; Bittner et al., 2013; Li y Wang, 2014).

1.3. Dinámica conformacional de partículas víricas

Los virus son capaces de llevar a cabo múltiples funciones biológicas utilizando un número mínimo de elementos estructurales, que en muchos casos incluyen únicamente una cápsida muy sencilla y el ácido nucleico genómico (Rossmann y Johnson, 1989; Chiu et al., 1997; Agbandje-McKenna y McKenna, 2011; Bothner y Hilmer, 2011; Caston, 2013). Por ejemplo, la partícula vírica ha de ser lo suficientemente robusta como para evitar la pérdida de integridad en condiciones desfavorables, pero también ha de ser conformacionalmente lábil para, por ejemplo, liberar el material genético dentro de la célula. Una solución para satisfacer estas condiciones contradictorias es alcanzar un balance delicado entre estabilidad e inestabilidad; otra solución más sofisticada consiste en desarrollar una partícula metaestable (Mateu, 1995; Johnson, 2003; Mateu, 2013c; Mateu, 2013a; Suomalainen y Greber, 2013).

Para que una partícula vírica metaestable pase de un estado conformacional a otro de menor energía libre necesita, por definición, un sustancial aporte de energía (igual a la energía de activación) que le permita alcanzar la energía del estado de transición de la reacción. *In vivo*, este aporte de energía puede llegar, además de a través de fluctuaciones térmicas, como consecuencia de, por ejemplo, la unión de la partícula vírica al receptor celular, o la liberación de o interacción con un factor (molécula) de la célula o del virus, o la acidificación del medio en un endosoma. *In vitro*, estos mismos cambios conformacionales pueden ser inducidos de otras maneras, por ejemplo aumentando la temperatura del medio (Carreira et al., 2004; Reguera et al., 2004; 2005).

La metaestabilidad de los virus puede no solo conferir una ventaja biológica permitiendo o facilitando el proceso de infección; también puede convertirse en un talón de Aquiles cuando un cambio conformacional se dispara a destiempo por causas ajenas al propósito inicial del mismo, inactivando biológicamente la partícula. Esto ocurre, por ejemplo, cuando el virus encuentra un ambiente extracelular suficientemente cálido, como se ha demostrado para picornavirus como FDMV (Mateo et al., 2008) o poliovirus (Hogle, 2002), y para otros virus.

Debido a su relevancia biológica, el estudio de la dinámica conformacional de partículas víricas resulta especialmente interesante (Belnap et al., 2000; Smyth y Martin, 2002; Johnson, 2003; Cotmore y Tattersall, 2007; Johnson, 2010; Bothner y Hilmer, 2011; Castellanos et al., 2012a; Mateu, 2013b). Los cambios conformacionales directamente implicados en procesos de encapsidación, maduración o desencapsidación, por ejemplo,

suelen estar relacionados con el fenómeno de metaestabilidad, implican cambios estructurales más o menos generales de la partícula, y suelen ser irreversibles (ver, por ejemplo (Fricks y Hogle, 1990; Conway et al., 2001; Liepold et al., 2005; Bothner y Hilmer, 2011; Delgui y Rodríguez, 2013; San Martín, 2013)).

Es importante resaltar que existe otro tipo de dinámica conformacional de las partículas víricas, que ocurre de forma reversible en el equilibrio, y que se ha denominado “respiración” (*breathing*) (Witz y Brown, 2001; Johnson, 2003; Bothner y Hilmer, 2011; Mateu, 2013b). En equilibrio, una partícula vírica puede muestrear varias conformaciones similares a la conformación de menor energía libre, lo que le permite variar la exposición de distintos motivos estructurales, incluyendo algunos que han de intervenir en etapas del ciclo vírico. La respiración de la partícula vírica es un fenómeno global, aunque algunas regiones o elementos estructurales suelen presentar un mayor dinamismo. A continuación se citan algunos ejemplos de dinamismo local en virus. En FMDV existe un bucle encargado de la unión al receptor celular que tiene una enorme movilidad, permitiéndole adoptar posiciones muy variadas; esta flexibilidad local parece ser relevante en aspectos del reconocimiento de la cápsida por anticuerpos y por el receptor celular (Mateu y Verdaguer, 2004; Fry et al., 2005). En el rinovirus humano (HRV) se expone de forma transitoria el Nt de las proteínas estructurales VP1 y VP4 (Li et al., 1994; Reisdorph et al., 2003) los cuales están implicados en la entrada a la célula y la liberación del genoma. De hecho se ha podido comprobar que impidiendo dicha respiración viral utilizando ciertas moléculas orgánicas se bloquea la extrusión de extremos Nt, inhibiendo la infectividad del virus (Lewis et al., 1998). Otro ejemplo de *breathing* se encontró en el virus de la cabaña (*Flock House Virus*) en el cual, mediante digestión con proteasas y espectroscopía de masas se demostró la extrusión de ciertos dominios que en principio estaban interactuando con el ARN en el interior de la cápsida (Bothner et al., 1998; Bothner y Hilmer, 2011).

En definitiva, los estudios funcionales y estructurales muestran que muchas partículas víricas son entidades conformacionalmente muy dinámicas. Algunas de ellas han adquirido evolutivamente una característica metaestabilidad que les permite cumplir satisfactoriamente con sus funciones biológicas. Un mejor conocimiento de la dinámica conformacional de los virus puede ser clave tanto para entender el funcionamiento de los mismos, como para el desarrollo de algunas de sus aplicaciones bio y nanotecnológicas.

1.4. Potencial electrostático en partículas víricas

Diferentes estudios han demostrado la importancia de las fuerzas electrostáticas en algunos procesos virales, como el ensamblaje de la cápsida (Durham et al., 1971) o el empaquetamiento del material genético (Bancroft et al., 1969; Bink y Pleij, 2002), especialmente en virus ARN (Belyi y Muthukumar, 2006; Ruigrok et al., 2011; Ni et al., 2012). A continuación se revisan los resultados de algunos estudios relevantes sobre influencia de las fuerzas electrostáticas en distintos aspectos de la biología de los virus.

1.4.1. Influencia de las fuerzas electrostáticas en el ensamblaje, desensamblaje y estabilidad de la cápsida

Existen diversos trabajos, tanto teóricos como experimentales, en los que se estudia la importancia de las fuerzas electrostáticas durante el ensamblaje de las cápsidas víricas y sobre la estabilidad las mismas. En algunos casos, como el de HIV, pueden estar regulando el correcto ensamblaje de los capsómeros que posteriormente formarán la cápsida (Brun et al., 2010). Además, en las interfases entre las subunidades que forman la cápsida madura de este virus se han detectado repulsiones electrostáticas que pueden ser responsables de la baja estabilidad física de esta cápsida (Douglas et al., 2004; del Alamo y Mateu, 2005; Mateu, 2009).

En otros casos, las interacciones electrostáticas pueden estar regulando el ensamblaje de la cápsida en sí misma (Garmann et al., 2014), como ocurre en TMV. Apantallando la carga eléctrica mediante la adición de sales al medio, se consiguieron ensamblar cápsidas vacías, sin la participación del ARN vírico. Este efecto se debe a la existencia de repulsiones electrostáticas entre subunidades de la cápsida mediadas por ciertos grupos carboxilato (Durham et al., 1971; Stubbs, 1999).

Otro aspecto regulado por fuerzas electrostáticas en algunos virus es el desensamblaje de la cápsida, como ocurre en el virus 40 vacuolado del simio (SV40) (Kawano et al., 2009). Otro ejemplo bien conocido es el de FMDV. En la cápsida de este virus se encuentran ciertas histidinas cercanas a las interfases entre pentámeros, que se protonan cuando el virus entra en los endosomas, generando fuerzas electrostáticas repulsivas entre pentámeros que promueven el desensamblaje de la cápsida (Acharya et al., 1989; van Vlijmen et al., 1998; Maree et al., 2013). Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado recientemente que en FMDV la resistencia térmica del virión, incluso a pH neutro, está modulada por fuerzas electrostáticas. Varios carboxilatos cercanos a las interfases entre pentámeros establecen repulsiones electrostáticas entre sí que reducen la

resistencia a la disociación térmica de la partícula, y que pueden manipularse para obtener viriones termoestables con fines vacunales (Mateo et al., 2008; Rincon et al., 2014).

1.4.2. Influencia del potencial electrostático en el empaquetamiento del ácido nucleico en el virión

Un ácido nucleico libre presenta una fuerte carga negativa a pH fisiológico, lo que supone una dificultad añadida a la hora de empaquetarlo dentro de una cápsida vírica si dicha carga no se neutraliza (parcial o totalmente) de algún modo. Esta dificultad puede aumentar en el caso de muchos virus esféricos sin envuelta, donde el tamaño relativo del material genético lleva a su empaquetamiento a densidades muy elevadas, similares a las presentes en cristales de ácidos nucleicos (P.J. Jardine, 2006; Comolli et al., 2008), que pueden generar fuertes presiones dentro de la cápsida (Smith et al., 2001; Petrov et al., 2007; Hernando-Perez et al., 2012). Por ejemplo, para el bacteriófago ϕ 29 se ha demostrado experimentalmente la importancia de contrarrestar el exceso de carga negativa del ADN para que se inicie el empaquetamiento del genoma (Fuller et al., 2007).

Diferentes virus han adquirido diferentes mecanismos para neutralizar, al menos en parte, el exceso de carga negativa debido al material genético, y así facilitar el empaquetamiento del genoma sin desestabilizar excesivamente la partícula vírica. Uno de los más frecuentes consiste en la presencia de un exceso de residuos ácidos en la cara interna de la cápsida (Tao Hu, 2008). Algunos virus ARN cs constituyen ejemplos bien estudiados de la neutralización de parte de la carga del material genético por este mecanismo, y de su influencia en el empaquetamiento del genoma y en el ensamblaje y la estabilidad del virión (van der Schoot y Bruinsma, 2005; Forrey y Muthukumar, 2009; Garmann et al., 2014).

Por ejemplo, la cápsida del virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) presenta un exceso de residuos cargados positivamente en su interior, situadas especialmente en el Nt de las subunidades de la cápsida, que no solo compensan el exceso de carga negativa del genoma almacenado, sino que además dirigen el proceso de ensamblaje del virus en torno al ARN (Speir et al., 1995; Fox et al., 1998; Annamalai et al., 2005).

Usando el virus del mosaico del bromo (BMV), Ni y colaboradores llevaron a cabo mutaciones en los segmentos Nt -ricos en aminoácidos básicos- de la proteína estructural que interaccionan con el ARN, para dilucidar el efecto de la adición o eliminación de cargas positivas sobre el empaquetamiento del ARN. Observaron que aquellos mutantes con menos cargas positivas en los Nt encapsidaron menores cantidades de ARN, mientras que

los mutantes con más cargas positivas en dichos segmentos empaquetaron mayores cantidades de ARN (Ni et al., 2012). Aunque los autores matizan que los cambios realizados sobre la carga electrostática no dan cuenta de todos los efectos producidos sobre el empaquetamiento del ARN.

Otros virus, como SV40 cuyo genoma es ácido desoxiribonucleico (ADN) de cadena doble (cd) reclutan histonas celulares, cargadas positivamente, para contrarrestar parte de la carga negativa del mismo (Germond et al., 1975; Polisky y McCarthy, 1975). Los adenovirus codifican proteínas básicas que forman complejos con su ADN genómico (Sung et al., 1983).

En otros casos se ha demostrado que parte de la carga negativa del ácido nucleico vírico es neutralizada por la unión de cationes de pequeño tamaño, incluyendo iones metálicos o moléculas orgánicas policatiónicas como la espermina. Por ejemplo, tanto el bacteriófago T4 como herpesvirus contienen en su interior poliaminas que ayudan a contrarrestar la fuerte carga negativa de sus genomas; dichas poliaminas pueden ser sustituidas por otros cationes (Tabor y Tabor, 1984). En el fago $\phi 29$ se ha estudiado el efecto de distintos cationes (Na^+ , Mg^{2+} y Co^{3+}) en el empaquetamiento del genoma y se ha podido comprobar que sin la presencia de iones Mg^{2+} no es posible empaquetar el genoma completo (Fuller et al., 2007). Los diferentes mecanismos comentados, y otros, no son excluyentes y pueden contribuir en diferentes medidas a la neutralización de la carga negativa del material genético, al empaquetamiento del genoma, y a la estabilización relativa del virión.

1.4.3. Influencia de las cargas eléctricas en la dinámica conformacional de los virus

Entre las diversas formas utilizadas por diferentes virus para controlar transiciones conformacionales biológicamente relevantes se encuentran los cambios en el potencial electrostático de la cápsida o el virión. Estos cambios pueden ocurrir en función de variaciones en el pH a través de diferentes mecanismos (Ausar et al., 2006). Por ejemplo, en CCMV un cambio de pH provoca la creación 60 poros de 2 nm de diámetro que sirven para el intercambio de moléculas de gran tamaño con el medio (Liepold et al., 2005). En otros casos, los cambios en el potencial electrostático no están mediados por variaciones de pH. Por ejemplo, durante el proceso de maduración del bacteriófago HK97, la estabilización del paso de precabeza a cabeza, en que la cápsida se expande, parece dirigida por las fuerzas electrostáticas repulsivas entre el ADN cd viral que se está

empaquetando y los residuos ácidos de la cara interna de la precabeza (Conway et al., 2001).

En la estructura cristalográfica de parvovirus como CPV o MVM se han observado un número muy limitado de cationes divalentes interaccionando directamente con unos pocos grupos fosfatos en segmentos de ADN cs unidos a la pared interna de la cápsida (Xie y Chapman, 1996; Agbandje-McKenna et al., 1998). En MVM, la adición de un agente quelante de cationes divalentes provoca la externalización del ADN vírico en experimentos *in vitro*, lo que sugiere la posibilidad de que interacciones entre estos cationes y el ADN contribuyen a mantener el genoma empaquetado (Cotmore et al., 2010).

En conclusión, existe una clara evidencia sobre la influencia de residuos cargados y del potencial electrostático de partículas víricas sobre sobre diferentes propiedades y funciones biológicas de estas partículas. Sin embargo, existen aún muchos interrogantes sobre este tema. Por ejemplo, en nuestro conocimiento no se ha realizado hasta el momento ningún estudio sistemático del papel estructural y funcional de residuos cargados en el interior de una cápsida vírica.

1.5. Propiedades mecánicas de las partículas víricas

Desde la primera vez que se observó una partícula vírica (ϕ 29) utilizando un microscopio de sonda de barrido (*scanning probe microscope*, SPM) en 1985 (Baro et al., 1985) estos microscopios se han utilizado para visualizar y estudiar los virus (Kuznetsov y McPherson, 2011). De entre ellos destaca, con diferencia, el AFM (Binnig et al., 1986), por su capacidad para visualizar complejos biológicos como los virus en condiciones cercanas a las fisiológicas (de Pablo, 2013; de Pablo y Carrion-Vazquez, 2014). Además, aprovechando las características que presenta el AFM, en las que se establece una interacción entre una parte del microscopio (la punta) y el objeto, durante la última década se ha venido utilizando el AFM para estudiar las propiedades mecánicas de partículas víricas, así como sus posibles implicaciones biológicas y nanotecnológicas.

1.5.1. El microscopio de fuerzas atómicas

El AFM es un tipo de SPM basado en la determinación de las interacciones que surgen del contacto directo entre una punta de radio nanométrico y una muestra, independientemente de la existencia de una diferencia de potencial entre la punta y la muestra, condición imprescindible en los microscopios STM anteriores al AFM (Binnig et al., 1986). En una de sus aplicaciones más sencillas, un AFM permite obtener imágenes

topográficas de objetos individuales con resolución nanométrica, mediante la determinación de la altura de cada punto del objeto, previamente inmovilizado sobre un soporte sólido.

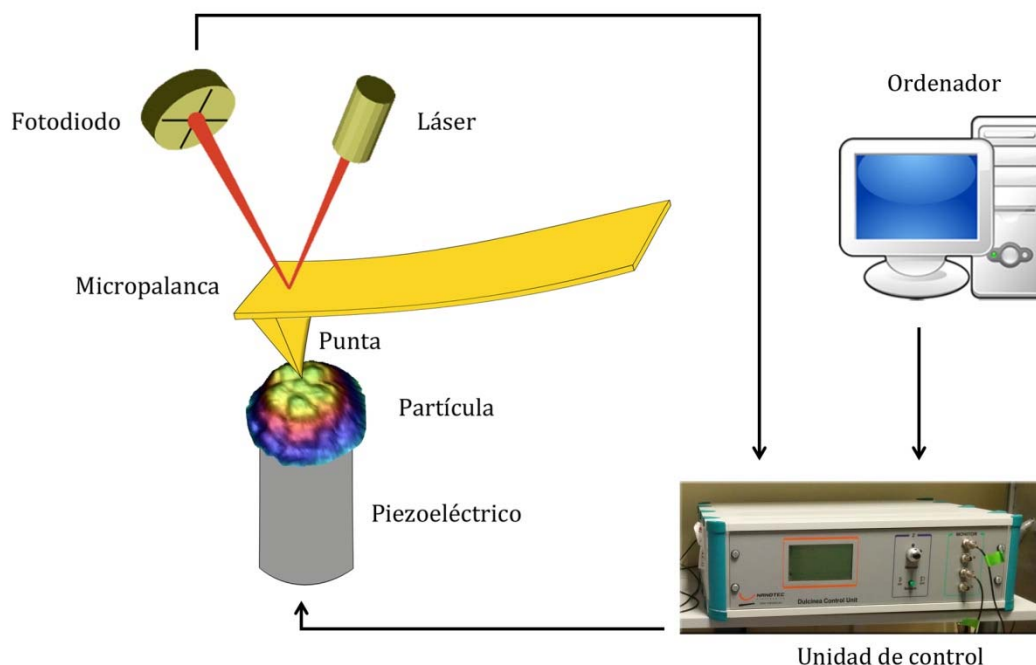


Figura 2. Esquema básico y funcionamiento de un AFM en modo imagen. La unidad de control aplica un voltaje sobre el piezoeléctrico provocando que éste se expanda o se contraiga, desplazando verticalmente la muestra (partícula) de su posición y generando, a través del contacto partícula-punta, cambios en la deflexión de la micropalanca. Estos cambios son registrados gracias a la variación del ángulo con el que incide un haz láser sobre la micropalanca, que se refleja en ella y alcanza un fotodiodo. Esta información es recogida por la unidad de control, donde un sistema de retroalimentación ajusta los parámetros necesarios para mantener constante la fuerza entre punta y muestra, lo que permite determinar, con respecto al soporte, la altura de la muestra respecto en el sitio de contacto con la punta del microscopio. El movimiento de la muestra a lo largo de los dos ejes horizontales mediante la expansión o contracción controladas del piezoeléctrico en estas direcciones permite la medición de la altura de cada punto de la muestra, generando un mapa topográfico. Se da una descripción más detallada en el texto.

Un esquema de un AFM se muestra en la Figura 2. En una configuración típica (como la que utilizamos en nuestro laboratorio), la muestra (partículas víricas en un tampón fisiológico, inmovilizadas sobre vidrio silanizado) se coloca sobre un soporte especial para muestras líquidas, que a su vez descansa sobre un material piezoeléctrico. Dicho material puede dilatarse en las tres direcciones del espacio (x , y , z) como respuesta a voltajes aplicados desde la unidad de control. Sobre la muestra se coloca una micropalanca flexible o *cantilever* que lleva en su extremo una punta de radio nanométrico en su parte final. Dicha punta interacciona con la muestra gracias al movimiento del piezoeléctrico, que en su dilatación vertical (z) aproxima ambas (punta y muestra) hasta que éstas contactan.

Para controlar la fuerza de interacción que surge entre la punta y la muestra se hace incidir un haz láser sobre la micropalanca y este a su vez se refleja en un fotodiodo. Cuando la micropalanca se deflexiona el ángulo de incidencia del haz láser sobre la misma varía, y por tanto lo hace la posición en que el haz se refleja sobre el fotodiodo. Las variaciones en la posición del haz láser sobre el fotodiodo son transmitidas a la unidad de control la cual, mediante un sistema de retroalimentación, ajusta la dilatación del piezoeléctrico en el eje z para que las fuerzas se mantengan dentro del rango que se ha establecido. De este modo se determina la altura de la muestra (p.ej., partícula vírica) en el punto de contacto con la punta del microscopio. La muestra se desplaza lateralmente a lo largo de los ejes horizontales y el proceso de determinación de altura se repite para cada punto (x, y) , generando un mapa topográfico. Como ejemplo, la Figura 3 muestra imágenes obtenidas mediante AFM de partículas individuales de MVM.

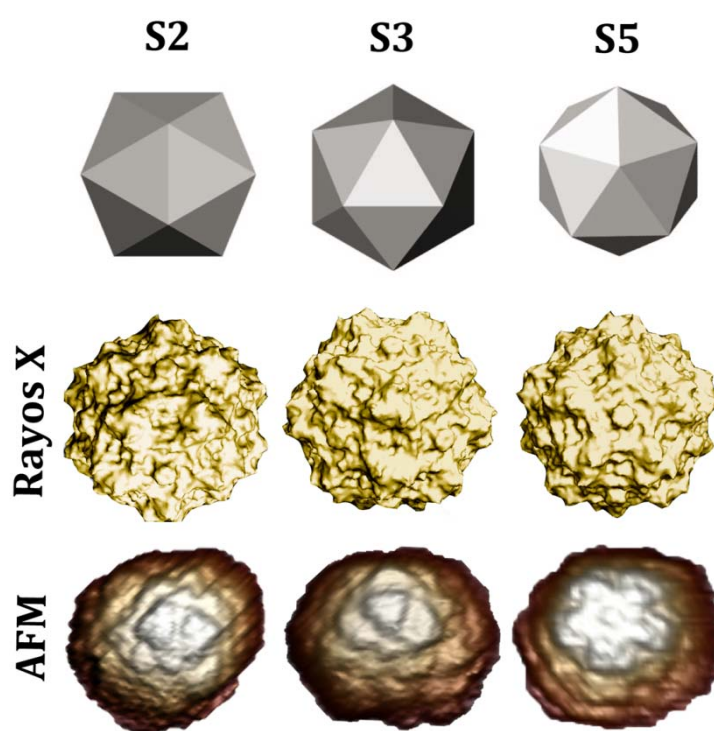


Figura 3. Características topográficas de MVM visualizadas mediante AFM.

Arriba: modelo ideal de un icosaedro observado a lo largo de un eje de simetría binario (S2), ternario (S3) o quinario (S5); Centro: Modelo de la cápsida icosaédrica de MVM obtenido a partir de su estructura cristalográfica, orientado del mismo modo que el icosaedro. Abajo: Imágenes de cápsidas individuales de MVM orientadas del mismo modo que el modelo cristalográfico y el icosaedro. Las zonas de mayor altura se indican en tonalidades más claras.

Aunque el AFM puede funcionar en muchos modos de operación distintos, en nuestro laboratorio utilizamos generalmente el modo de salto o *jumping mode* (De Pablo et al., 1998), ya que es apropiado para muestras biológicas relativamente blandas. En este modo, los movimientos de piezoeléctrico hacen que el contacto entre punta y muestra sea intermitente. Según se escanea en las direcciones x e y , se efectúa un ciclo completo de retracción y expansión entre cada punto analizado, consiguiendo minimizar las fuerzas de arrastre.

Visualización de partículas víricas. Para visualizar partículas víricas individuales mediante AFM han de sucederse múltiples ciclos de aproximación punta muestra (eje z) conocidos como curva Fuerza (F)-distancia (z) (curva Fz). Este ciclo consta de varias etapas que se describen en detalle en la Figura 4. Cuando se obtienen imágenes de muestras biológicas se debe utilizar una fuerza máxima suficientemente baja, de modo que la muestra no sea (apenas) deformada por la punta, de tal forma que el desplazamiento del piezoeléctrico sea un reflejo directo de la altura de la muestra en dicho punto. La realización y registro de curvas Fz en el plano (x, y) componen una imagen tridimensional de la partícula estudiada que permite identificar sus características topográficas. El estudio de estas características permite determinar la integridad y orientación de la partícula (Figura 3). La comparación de imágenes obtenidas a lo largo del tiempo permite seguir la evolución temporal de una partícula. Del mismo modo, la comparación de imágenes antes y después de distintas intervenciones físico-químicas permite el estudio del efecto provocado sobre dicha partícula individual de dichos agentes químico-físicos. Por ejemplo, se puede realizar una indentación mecánica (explicada más abajo) sobre la partícula y mediante la realización de una nueva imagen comprobar el efecto que dicha agresión mecánica ha tenido sobre la misma. Si la partícula ha mostrado un comportamiento elástico las imágenes anterior y posterior serán iguales, pero si no ha sido así la imagen posterior mostrará una variación de las propiedades topográficas de la partícula que puede corresponder a una pérdida de integridad, un cambio conformacional o a un desplazamiento de la partícula.

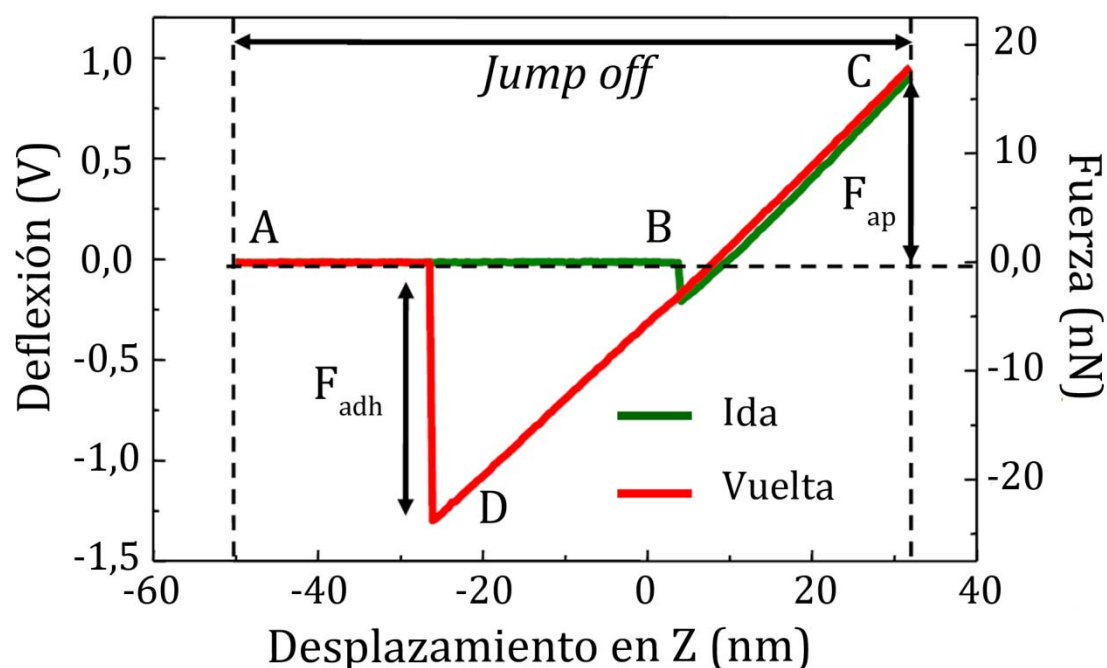


Figura 4. Explicación gráfica de una curva Fz. Se indica la deflexión de la micropalanca, que puede convertirse en el valor de la fuerza F en función del desplazamiento relativo punta-muestra a lo largo del eje z . La fase aproximación entre punta y muestra se indica en verde, y la fase retracción se muestra en rojo. **A:** punto inicial en el que el piezoeléctrico comienza a dilatarse acercando la muestra a la punta. **B:** punto en el que la muestra y la punta contactan. Se aprecia una pequeña deflexión negativa provocada por las fuerzas atractivas que surgen entre la punta y la muestra. **C:** punto de deflexión máxima de la punta. La diferencia entre el voltaje original en A y C es la fuerza aplicada sobre nuestra muestra (F_{ap}). Este punto es seleccionado por el usuario (*set point*). Llegados a él, el sistema de retroalimentación comienza a retraer el piezoeléctrico para que la fuerza ejercida no supere la establecida. **D:** El piezoeléctrico se retrae alejando la muestra de la punta. La distancia necesaria para separar éstas es mayor de la esperada porque aparecen fuerzas de adhesión entre ellas (F_{adh}). Finalmente punta y muestra vuelven a sus posiciones originales (punto A). Adaptado de (Carrasco, 2008).

Determinación de la rigidez mecánica de partículas víricas. El primer experimento en que se utilizó un AFM para determinar propiedades mecánicas de una partícula vírica en condiciones cercanas a las fisiológicas fue realizado por P.J. de Pablo junto a sus colaboradores en el laboratorio de C. Schmidt (Ivanovska et al., 2004). Desde entonces se ha realizado un cierto número de trabajos en los que se han determinado las propiedades mecánicas de diversos virus (Carrasco et al., 2006; Kol et al., 2006; Michel et al., 2006; Kol et al., 2007; Carrasco et al., 2008; Liashkovich et al., 2008; Arkhipov et al., 2009; Carrasco et al., 2011; Evilevitch et al., 2011; Ivanovska et al., 2011; Mateu, 2012; de Pablo y Mateu, 2013). La determinación de la rigidez mecánica de una partícula vírica en medio líquido mediante AFM se realiza de la siguiente manera: en primer lugar, se obtiene una imagen como se acaba de describir (ver más arriba) de la partícula para localizarla y, a ser posible, determinar su orientación mediante la identificación de algunas características

topográficas (Figura 3). A continuación la punta se centra sobre la partícula y se realizan una serie de indentaciones de elevada fuerza sobre ésta, obteniendo en cada caso una curva F_z como la descrita en la Figura 4. Cada ciclo completo de movimiento en el eje z consta de varias etapas: aproximación, contacto, deflexión de la micropalanca hasta una fuerza predeterminada (*set point*) y retracción. Durante la aproximación la punta está libre de interacciones más allá de las fuerzas generadas por los desplazamientos del líquido en el que se encuentra. Instantes antes del contacto punta-muestra pueden aparecer fuerzas atractivas o repulsivas, generalmente de origen electrostático, entre ambas que se ven suelen ver reflejadas en la F_z . A continuación viene la región lineal de la F_z , que corresponde tanto a la deformación la partícula como a la deflexión de la micropalanca. Hay que tener en cuenta que a diferencia de cuando sólo se está haciendo imagen, durante la realización de indentaciones de alta fuerza, tanto la micropalanca como la partícula vírica sufrirán deformaciones considerables en función de la rigidez de cada una. Los estudios experimentales y teóricos sobre el comportamiento mecánico de partículas víricas esféricas indican que pueden describirse con el modelo de cáscara delgada (Landau y Lifshitz, 1986). En él se predice que la fuerza depende linealmente de la deformación hasta indentaciones similares al espesor de la pared indentada (Ivanovska et al., 2004; Schaap et al., 2006; Carrasco et al., 2008). Con estas consideraciones, la rigidez de la partícula en el punto y dirección de la indentación, definida por la constante elástica (k_s) se calcula considerando la micropalanca y la partícula como dos muelles en serie (Figura 5), y utilizando la ley de Hooke: $F = -kx$, (donde F corresponde a la fuerza aplicada a un muelle; k es la constante elástica del muelle y x el desplazamiento (compresión o extensión) del muelle) (Meyer y Amer, 1988). En la Figura 5 se indican como ejemplo dos F_z s realizadas sobre dos sustratos distintos: en negro sobre una superficie indeformable, por lo que se aprecia una región lineal que depende únicamente de la deflexión de la micropalanca; en verde una F_z realizada sobre una partícula vírica deformable. Tras el contacto se aprecia primero una región lineal que corresponde a la mencionada indentación en la que la deformación depende linealmente de las fuerzas aplicadas y, a continuación, una zona no lineal precedida de un salto que corresponde a una deformación no elástica de la partícula o a una pérdida de contacto punta-muestra. Los detalles experimentales de las condiciones concretas usadas en nuestros estudios se describen en el apartado 3.13.

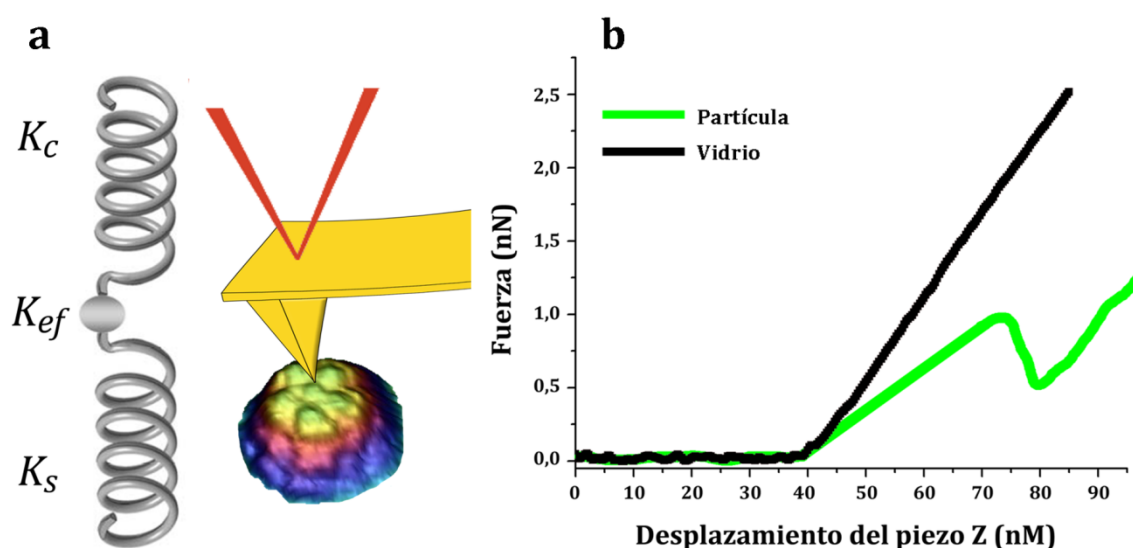


Figura 5. Representación gráfica y esquemática del proceso de indentación de una partícula vírica mediante AFM. a) A la izquierda, micropalanca y partícula vírica se comportan como un sistema de dos muelles en serie con constantes elásticas k_c y k_s respectivamente, dando lugar a una constante elástica efectiva del sistema k_{ef} . Esta última se puede determinar experimentalmente mediante la realización de indentaciones sobre la partícula y la obtención de las correspondientes curvas Fz. **b)** Representación gráfica Fz del resultado de dos indentaciones utilizando AFM, una directamente sobre un material indeformable (negro) y la otra sobre una partícula vírica inmovilizada sobre un material indeformable (verde). La constante elástica de la partícula se calcula como se indica en el apartado 3.13.5. Adaptado de (Carrasco, 2008).

1.5.2. Determinantes moleculares de las propiedades mecánicas de los virus

El primer virus para el que se determinó la rigidez mecánica en condiciones cercanas a las fisiológicas fue el bacteriófago $\phi 29$ (Ivanovska et al., 2004). A este trabajo pionero le han seguido otros con el mismo virus (Carrasco et al., 2011; Ivanovska et al., 2011) o con otros fagos, como λ (Ivanovska et al., 2007; Evilevitch et al., 2011; Hernando-Perez et al., 2014a), HK97 (Roos et al., 2012) y T7 (Hernando-Perez et al., 2014b); o con algunos virus animales o de plantas, entre los que se incluyen: MVM (realizados en colaboración entre nuestro grupo y el del Dr. de Pablo) (Carrasco et al., 2006; Carrasco et al., 2008); CCMV (Michel et al., 2006) el virus de la leucemia murino (MLV) (Kol et al., 2006) y HIV (Kol et al., 2007); el virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) (Liashkovich et al., 2008; Sae-Ueng et al., 2014; Roos et al., 2009); HBV (Arkhipov et al., 2009); el virus Norwalk (Baclayon et al., 2011), y otros. Además de la rigidez, en algunos de estos trabajos se han determinado otras propiedades mecánicas, como la resistencia a la fractura o a la fatiga mecánica. Para revisiones recientes sobre los resultados obtenidos sobre mecánica de virus, y sus posibles implicaciones biológicas, ver (Mateu, 2012; de Pablo y Mateu, 2013).

Un aspecto muy importante, tanto desde el punto de vista del conocimiento de los virus como de sus posibles aplicaciones nanotecnológicas, es la identificación de los determinantes moleculares de las propiedades mecánicas de virus. Sin embargo, aún existen muy pocos estudios sobre este tema. Además, de los pocos disponibles, algunos comparan partículas que son estructural o conformacionalmente muy distintas, por lo que resulta difícil extraer conclusiones sobre las causas moleculares precisas de las diferencias mecánicas encontradas. Existen muy pocos trabajos sobre los determinantes moleculares de las propiedades mecánicas de los virus en que se han utilizado mutantes sencillos de una misma partícula vírica. Estos estudios han permitido identificar, de modo aun extremadamente limitado, algunas causas estructurales concretas de la rigidez o resistencia mecánica de estas partículas. Algunos de estos trabajos se resumen a continuación.

La comparación estructural y mecánica de CCMV y de un variante natural con la mutación K42R en la proteína de la cápsida permitió proponer que la rigidificación mecánica observada en el mutante se debe a la introducción de 660 nuevas interacciones entre subunidades de la cápsida (Michel et al., 2006).

El análisis mecánico de VLPs de norovirus mostró que las partículas son estables mecánicamente a pH ácidos y neutros, pudiendo soportar múltiples indentaciones de alta fuerza. Sin embargo a pH básico virus se encontró que las partículas mostraban una estabilidad mecánica mucho menor, desensamblándose tras una sola indentación (Cuellar et al., 2010). Los autores propusieron, aunque sin evidencia experimental directa, que la desprotonación de un residuo de lisina (K122) a pH elevado podría provocar un aumento de la repulsión entre algunos aspartatos cercanos, desestabilizando mecánicamente la partícula.

Finalmente, en una colaboración continuada de nuestro laboratorio con el grupo del Dr. de Pablo, hemos realizado un análisis de la rigidez mecánica de un elevado número de cápsidas y viriones mutantes de MVM. Los resultados demuestran que en éste virus la partícula vírica es mecánicamente reforzada anisotrópicamente por segmentos del ADN vírico unidos a su cara interna (Carrasco et al., 2006; Carrasco et al., 2008). Este refuerzo mecánico ocurre cerca de los ejes de simetría binarios (S2) y ternarios (S3) de la cápsida. En cambio, las regiones alrededor de los ejes de simetría quíntarios (S5) se encuentran libres de interacciones con el ADN y se mantienen conformacionalmente elásticas, lo que es biológicamente necesario para la infectividad del virión (Castellanos et al., 2012a). Durante estos estudios de nuestro laboratorio hemos demostrado, además, que es posible

manipular la rigidez mecánica de partículas víricas. La eliminación de algunas interacciones entre la cápsida y los parches de ADN aumentó la elasticidad de las regiones S2 y S3; la eliminación de algunas interacciones entre residuos de la cápsida generalmente aumentó la rigidez mecánica de esta, no solo en las regiones donde se introdujeron las mutaciones, sino, en bastantes casos, en otras regiones distantes (Castellanos et al., 2012a). Las causas estructurales de estos aumentos de rigidez no se determinaron.

En resumen, a pesar de los grandes avances realizados en muy pocos años, el conocimiento sobre las propiedades mecánicas de virus, y en especial sobre sus determinantes estructurales, y sus posibles implicaciones biológicas es aún muy limitado. Futuros estudios en estas direcciones prometen abrir nuevas perspectivas en la relación entre la física y la biología de los virus, con importantes consecuencias aplicadas en el campo de la nanotecnología.

1.6. El Virus Diminuto de Ratón (MVM)

Todo el trabajo realizado en esta Tesis doctoral ha sido llevado a cabo con uno de los sistemas modelo utilizados en nuestro laboratorio, MVM. Este virus pertenece al género *Parvovirus* de la familia *parvoviridae* (Berns, 1983; Tattersall y Cotmore, 1988; Berns y Young, 1995) y ha sido elegido para estos y otros estudios a causa de su gran sencillez estructural y del amplio conocimiento existente sobre su estructura, función y biología, además de por la posibilidad obtener de modo sencillo cápsidas vacías, desprovistas de genoma (partículas semejantes a cápsidas o *viral-like particles*, VLP). Existen dos variedades serológicamente indistinguibles de MVM que comparten un 97% de secuencia (Astell et al., 1987): la utilizada en este trabajo, llamada cepa prototipo (MVMp), que infecta a fibroblastos murinos (Crawford, 1966); y la cepa inmunosupresora (MVMi), que infecta linfocitos (Bonnard et al., 1976; Engers et al., 1981), precursores hematopoyéticos (Segovia et al., 1991; Segovia et al., 1995; Segovia et al., 1999) y varios tipos celulares del sistema nervioso central (Ramirez et al., 1996).

1.6.1. Estructura de MVM

La estructura de MVM ha sido resuelta tanto para el virión de la cepa MVMi (Llamas-Saiz et al., 1997; Agbandje-McKenna et al., 1998) como para la cápsida de la cepa MVMp (Kontou et al., 2005). Las cápsidas de las dos cepas difieren tan solo en 14 aminoácidos, y tanto estas diferencias como la presencia del ADN genómico apenas introduce cambios en la estructura tridimensional de la cápsida; los pocos cambios observados solo afectan ligeramente a la posición de algunos átomos en unas pocas regiones muy localizadas. Se

han resuelto además las estructuras de dos VLPs mutantes de MVM: MVMi L172A (Plevka et al., 2011) y, durante el desarrollo de esta tesis, MVMp N170A (Querol y Verdaguer, datos no publicados). En general, la estructura de MVM presenta pocas diferencias con las de otros parvovirus evolutivamente próximos, como el parvovirus canino (CPV) (Tsao et al., 1991) o el parvovirus felino (FPV) (Agbandje-McKenna et al., 1998).

La cápsida icosaédrica T=1 de MVM (Figura 6) tiene aproximadamente 25 nm de diámetro y está formada por 60 subunidades de estructura equivalente, a las que contribuyen 3 proteínas estructuralmente idénticas, excepto por la longitud de sus extremos Nt. Las proteínas VP1 y VP2 se encuentran en una proporción 1:5 en la cápsida del virión, y ambas provienen del mismo preARN por procesamiento alternativo (Cotmore y Tattersall, 1987). La proteína mayoritaria, VP2, contiene 587 aminoácidos (64 kD) y es capaz de formar VLPs estructuralmente idénticas a las cápsidas vacías naturales, aunque carecen de los extremos Nt de VP1 (Hernando et al., 2000; Kontou et al., 2005), cada uno de ellos constituido por 142 aminoácidos. Por otra parte en los viriones el extremo Nt (aproximadamente 25 aa) de algunas subunidades de VP2 es cortado proteolíticamente durante la entrada en la célula, generando la proteína VP3 (Tullis et al., 1992; Cotmore y Tattersall, 2007; Cotmore et al., 2010).

El plegamiento de las proteínas que conforman la cápsida es de tipo “sandwich” β (Figura 6), formado por ocho cadenas β antiparalelas como en la mayoría de cápsidas icosaédricas (Rossmann y Johnson, 1989). En MVM, este armazón se encuentra formando únicamente la capa inferior de la cápsida. La capa superior está formada por bucles que unen las cadenas β , que son especialmente largos e interaccionan de modo compejo entre sí. Estas interacciones dan lugar a grandes protuberancias (espículas) centradas en los ejes S3, y a estructura cilíndrica que forman canales (poros) en los ejes S5, quedando depresiones anulares entre cilindros y espículas, donde se localizan los ejes S2 (Llamas-Saiz et al., 1997; Agbandje-McKenna et al., 1998).

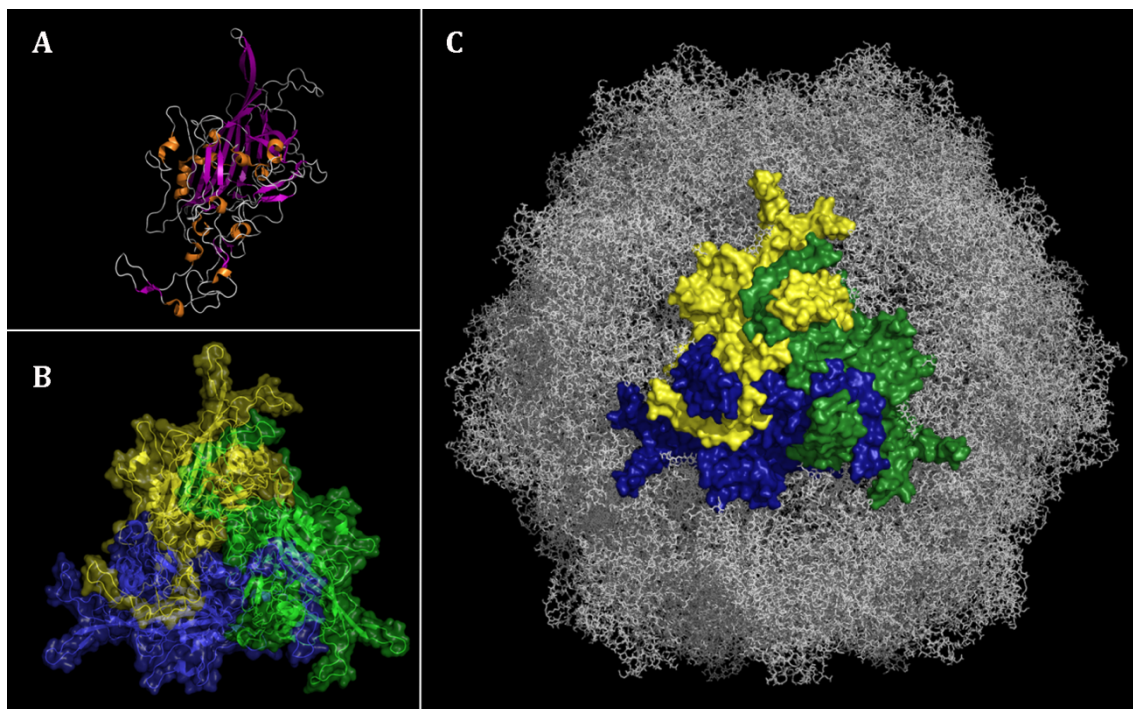


Figura 6. Representación gráfica de la estructura de la cápsida de MVM y sus componentes. **A)** Modelo de cintas de VP2 en la que se indican las cadenas β en magenta y cortos segmentos de hélice α en naranja. **B)** Modelo de superficie y cintas de un trímero de VP2, en el que cada una de las subunidades que lo forman se representa en un color distinto. **C)** Modelo de varillas de la cápsida completa de MVM, en la que un trímero se representa destacado en modelo de superficie como en B).

Las proteínas de la cápsida ensamblan formando trímeros estructuralmente equivalentes, que mantienen los mismos contactos con los trímeros adyacentes, y constituyen los elementos estructurales estables a partir de los cuales se ensambla la cápsida (Figura 6) (Lombardo et al., 2000; Lombardo et al., 2002; Rioloobos et al., 2006). La asociación de veinte trímeros forma la cápsida icosaédrica T=1 (Caspar y Klug, 1962) en la que las marcadas características topográficas permiten distinguir claramente la posición de los diferentes ejes de simetría S2, S3 y S5 (Figura 7).

La cápsida de MVM presenta varias cavidades conspicuas, regiones pobremente empaquetadas y localizadas en el interior del núcleo hidrofóbico de cada subunidad (Figura 8). Las cavidades mayores tienen un tamaño suficiente como para albergar varias moléculas de agua y están, en general, rodeadas por aminoácidos muy conservados (Chapman y Rossmann, 1993). Regiones pobremente empaquetadas iguales a estas se han observado en diversas proteínas celulares diversas y en otras cápsidas víricas. Algunas de estas regiones mal empaquetadas y cavidades presentan una clara relevancia funcional. Por ejemplo, la comparación de proteínas homólogas entre termófilos y mesófilos sugiere que un mayor empaquetamiento de residuos en el interior conlleva una mayor estabilidad,

a expensas de un menor dinamismo conformacional (Vallone y Brunori, 2004). En algunas proteínas las cavidades pueden jugar un papel esencial en la facilitación de cambios conformacionales, el control de la unión de su ligando y/o en el proceso de catálisis (Morini et al., 2005; Temussi, 2006; Clare et al., 2008). En algunas cápsidas víricas, como la de HRV o el poliovirus, existen cavidades de gran tamaño que tienen un papel importante en la dinámica conformacional necesaria para el proceso de infección (Smith et al., 1986; Chow et al., 1997; Rossmann et al., 1997). En el caso de MVM, mutaciones que alteran el tamaño y/o la forma de las cavidades mencionadas presentan ciertos efectos, aún no bien estudiados, sobre la dinámica conformacional de la cápsida, y/o la infectividad del virión (Carreira y Mateu, 2006) y/o la rigidez mecánica local y global de la cápsida (Castellanos et al., 2012a).

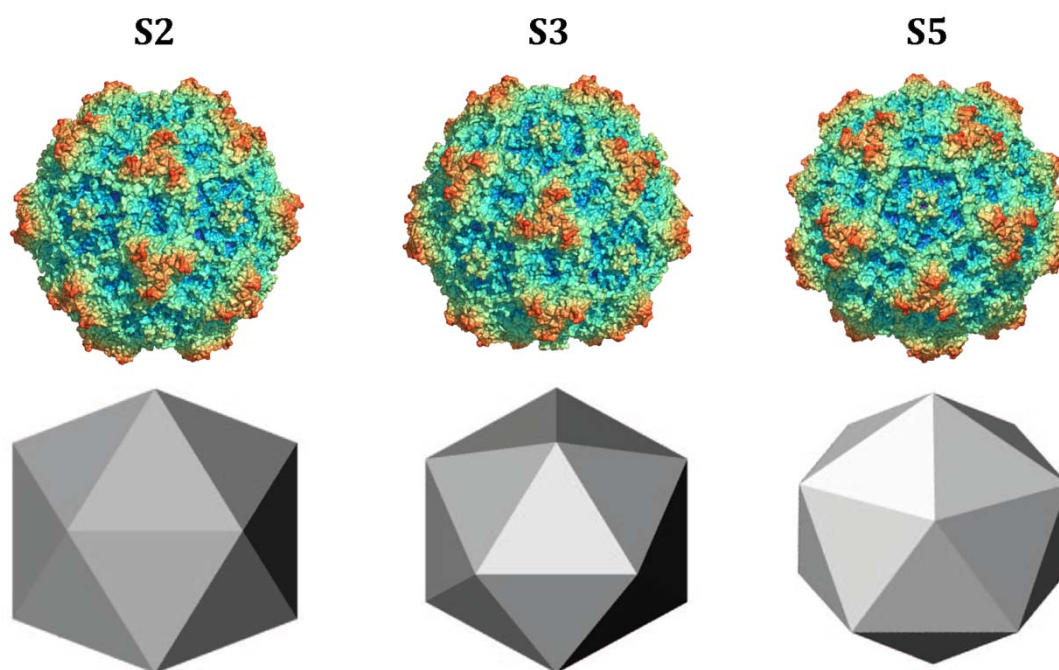


Figura 7. Estructura atómica de MVM vista a lo largo de un eje de simetría S2, S3 o S5. El espectro de colores destaca las características topográficas, con las zonas radialmente menos y más elevadas representadas en azul y rojo, respectivamente. La comparación con las proyecciones de un icosaedro ayuda a identificar las relaciones de simetría.

Como se ha mencionado más arriba, en el virión de MVM algunos segmentos del ADN genómico presentan una estructura similar, en forma de cuña, y se encuentran unidos a regiones cóncavas estructuralmente equivalentes de la pared interna de la cápsida (Figura 8) (Llamas-Saiz et al., 1997; Agbandje-McKenna et al., 1998; Kontou et al., 2005). Estas interacciones se encuentran conservadas en otros parvovirus como CPV. La interacción entre segmentos del genoma vírico y la cápsida no es una característica única

de estos parvovirus, sino que se ha observado en muchos otros virus, independientemente de su estructura (helicoidales o icosaédricos) o de su material genético (ADN o ARN). Sin embargo, las características estructurales y consecuencias funcionales de estas interacciones parecen ser muy diferentes según el caso. Por ejemplo, el ARN cs de TMV establece interacciones con cada subunidad de la cápsida contribuyendo al coensamblaje del virión y a la estabilidad de la cápsida (Holmes, 1979; Caspar y Namba, 1990). En el virus satélite del mosaico del tabaco (STMV), el 59% de su ARN cd es visible por cristalografía y aparece unido a la pared interna de la cápsida (Larson et al., 1993a y 1993b). El bacteriófago Φ X174 presenta el 12 % de su ADN cs unido a la cápsida a través de interacciones electrostáticas con una proteína interna de carácter básico (McKenna et al., 1992). En el caso de MVM, hemos demostrado la importancia de las interacciones entre los segmentos de ADN cs y la cápsida para reforzar la estabilidad del virión frente a su inactivación por calor (Reguera et al., 2005). Como ya se ha mencionado, encontramos además que algunas de estas mismas interacciones ADN-cápsida aumentan la rigidez mecánica local de la cápsida en las regiones cercanas a los sitios de anclaje del ADN, es decir alrededor de los ejes de simetría S2 y S3 (Carrasco et al., 2006; Carrasco et al., 2008).

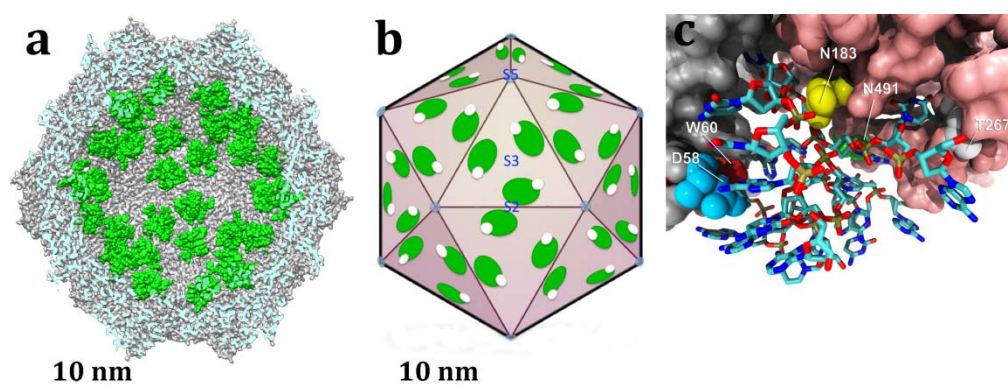


Figura 8. Representación de distintas características estructurales de MVM. **a)** Sección transversal de la estructura cristalográfica del virión de MVM. Los segmentos de ADN unidos a la pared interior de la cápsida se representan en verde. **b)** Representación esquemática de la arquitectura icosaédrica de MVM en la que se indican las posiciones aproximadas de los parches de ADN (verde) y de las cavidades mayores (blanco) (Castellanos *et al.*, 2015).

1.6.2. Ciclo biológico.

Diferentes aspectos del ciclo biológico de MVM han sido estudiados en profundidad por diversos grupos, destacando entre ellos los de P. Tattersall y J.M. Almendral (Agbandje y Chapman, 2006; Almendral, 2006; Riobobos et al., 2006; Valle et al., 2006; Cotmore y Tattersall, 2007) (Figura 9). El ciclo infectivo empieza con la adsorción del virus a receptores específicos de la membrana celular, entre los que destaca una sialoglicoproteína (Cotmore y Tattersall, 1987; Lopez-Bueno et al., 2006), a través de la

zona de unión al receptor, que se localiza en la depresión del eje de simetría S2 (Lopez-Bueno, 2002). A continuación la partícula entra por endocitosis en vacuolas recubiertas de clatrina (Linser et al., 1997) de las que los viriones salen de manera dependiente de pH (Ros et al., 2006). Durante este proceso parecen ocurrir cambios conformacionales que se bloquean si se aumenta el pH endosomal (Mani et al., 2006) y se digieren los extremos Nt de VP2 que se encuentran en el exterior formándose VP3 (Santaren et al., 1993; Mani et al., 2006). Todo ello permite la posterior externalización de los segmentos Nt de VP1 cuando el virión alcanza un ambiente vacuolar favorable (Cotmore y Tattersall, 2007; Cotmore et al., 2010). La actividad fosfolipasa A2 presente en el Nt de VP1 permite la salida del virión al citosol (Zadori et al., 2001; Tijssen et al., 2006). El Nt de VP1 presenta además una señal de localización nuclear (Lombardo et al., 2000; Valle et al., 2006) que permite la asociación con un poro nuclear y tal vez el transporte del virión completo al interior del núcleo. Bien en la región del poro nuclear, o ya dentro del núcleo, ocurre la desencapsidación del ADN, probablemente sin desensamblaje previo de la cápsida (Ros et al., 2006; Cotmore et al., 2010; Cotmore y Tattersall, 2014).

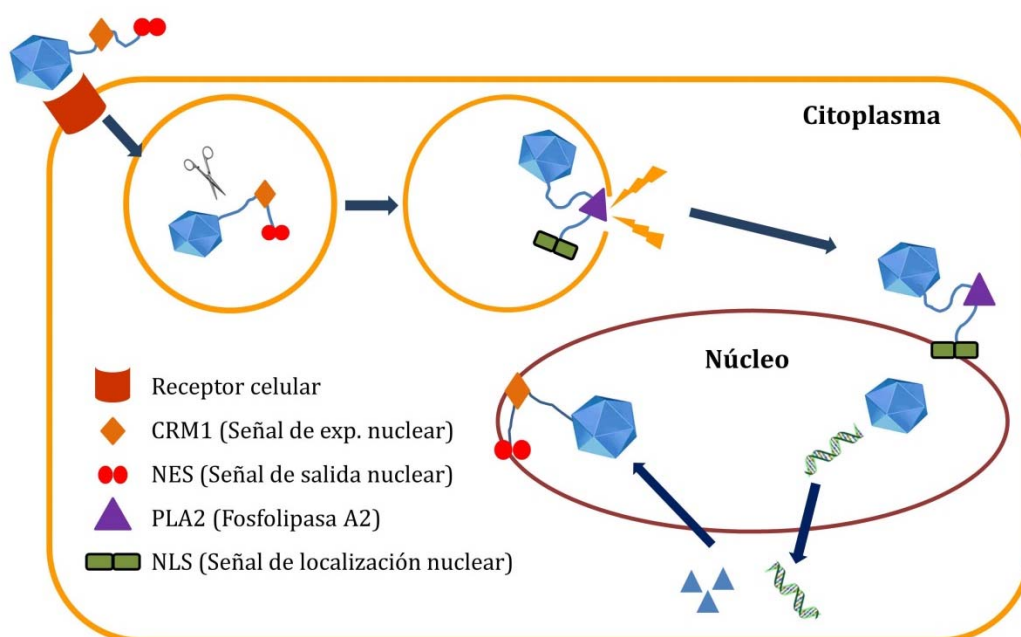


Figura 9. Esquema simplificado de algunas etapas del ciclo biológico de MVM. Se indican las etapas más importantes del mismo, así como algunos de los elementos implicados. El proceso se explica con detalle en el texto. Desde el ángulo superior izquierdo al inferior derecho se destacan la adsorción al receptor celular, la entrada por vía endosomal, el procesamiento del Nt de VP2 y extrusión del Nt de VP1, la entrada al núcleo y desencapsidación, transcripción a ARN, traducción de las proteínas de la cápsida, y asociación en trímeros, el transporte de éstos al núcleo, el ensamblaje de la cápsida, y la externalización del Nt de VP2 y salida del virión del núcleo.

La traducción de las proteínas víricas ocurre en el citoplasma, donde las VPs sintetizadas se ensamblan formando intermediarios triméricos compuestos solo por VP2 o por VP2 y VP1. Estos trímeros no forman cápsidas en el citoplasma, sino que son transportados al núcleo gracias a los motivos de localización nuclear que se forman durante el ensamblaje trimérico, como un proceso de morfogénesis controlada (Lombardo et al., 2000; Lombardo et al., 2002; Riobos et al., 2006). Una vez en el núcleo los trímeros adquieren competencia para ensamblar en cápsidas (Riobos et al., 2006) y a continuación ocurre la encapsidación del ADN a través de un poro situado en un eje S5 (Farr y Tattersall, 2004; Plevka et al., 2011). Dicha encapsidación es un proceso sobre el que aún existen importantes incógnitas. Algunos autores proponen que la proteína NS1 actúa como motor molecular para introducir el ADN en la cápsida en sentido 3'-5' (King et al., 2001; Yoon-Roberts et al., 2004; Cotmore y Tattersall, 2005; Cotmore y Tattersall, 2014), en parte gracias a la acción helicasa de esta proteína (Christensen y Tattersall, 2002; Iyer et al., 2004).

El siguiente paso en el ciclo de MVM es la salida del núcleo. Para ello es necesario que previamente se hayan externalizado los extremos Nt de VP2 que contienen la señal de salida del núcleo, como respuesta a la entrada de ADN genómico (Tattersall y Cotmore, 1988; Maroto et al., 2004; Almendral, 2006; Cotmore y Tattersall, 2014). En estudios realizados con MVM *in vitro*, un calentamiento moderado (que puede vencer la misma barrera energética que *in vivo* produciría la entrada del ADN en la cápsida) produjo dos efectos estructurales: la externalización del extremo Nt de VP2 (Hernando et al., 2000) y un cambio en la exposición al solvente de los triptófanos de la cápsida que se encuentra asociado con la externalización del Nt de VP2 (Carreira et al., 2004) a través de un proceso dinámico de reordenamiento conformacional que parece implicar una mayor apertura de los poros en los ejes S5.

Por último la liberación de las partículas víricas desde el citosol al exterior celular parece ocurrir en dos fases. En primer lugar pequeñas cantidades de virus serían liberadas al exterior celular mediante mecanismos no líticos y, finalmente, el grueso de la carga vírica sería liberado tras la lisis celular (Richards et al., 1977; Whittaker y Helenius, 1998; Maroto et al., 2004; Cotmore y Tattersall, 2014).

OBJETIVOS

2. Objetivos

Basándonos en los antecedentes descritos, nos planteamos estudiar diferentes aspectos biofísicos del ensamblaje y desensamblaje, y de los determinantes moleculares de propiedades mecánicas y funcionamiento de MVM como modelo de virus icosaédrico sencillo. Los objetivos concretos de ésta tesis doctoral fueron:

- I. El estudio de la posible importancia de residuos eléctricamente cargados situados en la cara interna de la cápsida sobre el ensamblaje, estabilidad, dinámica conformacional y funcionamiento de MVM. Los resultados contribuirían a desvelar nuevos aspectos del potencial electrostático y su distribución en partículas víricas.
- II. La identificación experimental y caracterización de los intermediarios transitorios de desensamblaje de la cápsida de MVM, utilizando una aproximación de “molécula única” mediante análisis por AFM. Los resultados contribuirían a validar predicciones teóricas sobre rutas de ensamblaje/desensamblaje de virus sencillos.
- III. El estudio mediante AFM de la relación entre rigidificación mecánica del virión de MVM mediada por interacciones cápsida-ADN, y la resistencia de este a la inactivación térmica. Los resultados contribuirían a desvelar la importancia biológica de las propiedades mecánicas de virus, y a establecer una relación intrínseca entre elasticidad mecánica y dinamismo conformacional en partículas víricas.
- IV. La disección, mediante mutagénesis sistemática a alanina y análisis mecánico por AFM, del papel de residuos individuales e interacciones en las interfases entre subunidades en la rigidez mecánica de la cápsida de MVM. Los resultados contribuirían a entender la relación entre estructura y propiedades mecánicas de partículas víricas, y al desarrollo de aproximaciones para mejorar la robustez mecánica de partículas víricas utilizables en biomedicina y nanotecnología.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1. Células y virus

3.1.1. Cepas de *Escherichia coli*, cultivo y transformación

DH10Bac: proviene de la cepa DH10B y presenta el genotipo F- *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ*M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* (*ara*, *leu*) 7697 *galU* *galK* λ - *rpsL* *nupG* /pMON14272 / pMON7124. Además contiene un bácmido derivado de baculovirus (apartado 3.2.3) y un plásmido auxiliar con el gen de la transposasa bacteriana Tn7. Las células se hicieron electrocompetentes siguiendo el protocolo *Electrocompetent Cell Production* (Invitrogen). Resumidamente, se crecieron 2 l de cultivo de células DH10Bac en medio LB hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,5-0,7 u.a. Tras enfriar 30 min en hielo se realizaron 4 lavados con agua miliQ estéril fría utilizando en cada uno la mitad de volumen del anterior. A continuación se centrifugaron a 4.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min a 4 °C. El *pellet* final de células se resuspendió en 2 ml de glicerol al 10% en agua, estéril y frío. Se congelaron alícuotas de 40 μ l en hielo seco y se almacenaron a -70°C.

JC8111: carece de las proteínas codificadas por los genes *recB*, *recC*, *recF* y *sbcB* (exonucleasas V y I), implicadas en la modificación de secuencias palindrómicas terminales (Boissy y Astell, 1985). Esta cepa permite la amplificación del plásmido infeccioso de MVMp sin producir alteraciones en el genoma viral, y fue proporcionada por el Prof. J. M. Almendral. Para la preparación de células JC8111 electrocompetentes se siguió esencialmente el mismo protocolo que para las células DH10Bac, pero con ligeras modificaciones: partiendo de una colonia aislada (cuya sensibilidad frente a la ampicilina se había testado) se llegó a obtener 1 l de cultivo (en medio LB) en fase de crecimiento exponencial, que se detuvo mediante enfriamiento en hielo durante 30 min cuando la OD_{600} alcanzó un valor de 0,6. Se realizaron dos lavados sucesivos con agua estéril fría utilizando volúmenes de 0,3x y 0,15x, en relación al volumen de cultivo de partida, y sedimentando las células cada vez por centrifugación a 3.500 rpm durante 15 min a 4 °C. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en 20 ml de glicerol al 10% estéril frío, centrifugó a 5.800 rpm durante 15 min a 4 °C y resuspendió en 2 ml de glicerol al 10% en agua estéril y frío. Se congelaron alícuotas de 80 μ l en hielo seco y se almacenaron a -70 °C.

XL1-Blue: células supercompetentes compradas a la casa *Stratagene*, presentan un genotipo $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kan^r [F' proAB lacIqZ\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$.

Cultivo: Todas las cepas de *E. coli* se crecieron en medio líquido LB o en medio sólido LB con agar bacteriológico “Europeo” (*Pronadisa*) al 1,5%, suplementados en su caso con el antibiótico de selección apropiado para el plásmido introducido. Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron los protocolos descritos en (*Sambrook y Russell, 2001*). Las suspensiones bacterianas se almacenaron suplementando con glicerol a una concentración final del 15%, se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Transformación: la transformación de *E.coli* XL1-Blue se llevó a cabo por choque térmico de la siguiente forma: se descongelaron en hielo las células, y para cada reacción de transformación se utilizaron 50 μl de bacterias a las cuales se añadió 1 μl de solución de ADN a la concentración adecuada. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min, luego a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 s y finalmente en hielo durante 2 min. Se añadieron 0,5 ml de medio LB precalentado, se incubó la muestra a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h con agitación (225-250 rpm), se concentraron las células por centrifugación a máxima velocidad en microfuga durante 1 min y, tras resuspender en un volumen final de 100 μl de LB, se extendieron sobre placas Petri con medio LB sólido con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda una noche.

Para la transformación de *E.coli* DH10Bac y JC8111 mediante electroporación se tomaron 40 u 80 μl de las bacterias competentes con 1 o 5 μl respectivamente de suspensión de ADN a la concentración adecuada o de mezcla de ligación. Se llevó a cabo en cubetas de 0,2 cm de separación entre electrodos (*Bio-Rad*). Se dio un pulso de 1,5 Kv, 25 μF y 200 Ω (DH10Bac), o de 2,5 Kv, 25 μF y 200 Ω (JC8111) utilizando un electroporador *Gene Pulser* (*Bio-Rad*). A continuación se resuspendieron rápidamente en 1 ml de LB y se incubó la muestra a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas con agitación de 100 rpm (DH10Bac) o 1 h a 225-250 rpm (JC8111). Las células JC8111 se concentraron, plaquearon e incubaron como se ha indicado antes para XL1-Blue, en presencia de los antibióticos adecuados. Las células DH10Bac no se concentraron, sino que se plaquearon directamente 0,01x y 0,1x del volumen original de células transformadas, en presencia de los antibióticos adecuados.

3.1.2. Células de insecto y su cultivo

Células *High-five* (H5): es una línea celular (BTI-Tn-5B1-4) obtenida a partir de la línea parental de *Trichoplusia ni*, suministrada por el Dr. J. Rodríguez.

Cultivo: Se utilizó medio de cultivo TC-100 (*Gibco*) suplementado con suero fetal bovino (SF) al 5% y sulfato de estreptomicina a 100 µg/ml, penicilina G a 100 U/ml, gentamicina a 50 µg/ml, aminoácidos no esenciales (L-Ala, L-Asn, L-Asp, L-Glu y L-Pro) 0,44 mM y L-Gln a 2mM. Cuando se utilizó SF para el cultivo de cualquier tipo celular, el complemento fue inactivado mediante calentamiento a 56 °C durante 30 min. Las células se incubaron a 27 °C (Carrascosa, 1994; Carrascosa et al., 1995). Cuando las células alcanzaron subconfluencia (80-90%) se recogieron mediante pipeteo en el propio medio de cultivo. Para su conservación, las células se congelaron a una concentración de aproximadamente $1,7 \times 10^6$ células/ml en medio TC-100 suplementado con 20% SF y 7,5% dimetilsulfóxido (DMSO; *Merck*) (Doyle et al., 1988), y se almacenaron en nitrógeno líquido.

3.1.3. Células de mamífero y su cultivo

NB324K: línea celular derivada de fibroblastos de riñón de recién nacido humano transformados con el antígeno T grande de SV40. Fue proporcionada por el Prof. J. M. Almendral.

Cultivo: Las células NB324K se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Gibco*) suplementado con sulfato de estreptomicina a 100 µg/ml, penicilina G a 100 U/ml, L-Gln a 4mM y SF al 5% o al 10%. Las incubaciones se realizaron a 37 °C en incubador de cultivo en una atmósfera que contenía un 7% CO₂ y al 95% de humedad relativa. Las células, crecidas en monocapa hasta subconfluencia (80-90%), se despegan utilizando una solución que contiene un 0,5% de tripsina (*Sigma*, 1,5 U/mg) y 0,02% de sal disódica del ácido etiléndiaminotetracético (EDTA) en tampón fosfato salino (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM KH₂PO₄ y 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,3). Para su conservación, las células se prepararon mediante criogenización según se describe en (Doyle et al., 1988), y se almacenaron en nitrógeno líquido.

3.1.4. Baculovirus, infección y titulación

Los baculovirus utilizados derivan del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica*. Los baculovirus recombinantes se obtuvieron como se describe en el apartado 3.2.3 de esta memoria.

Infecciones: Las infecciones en medio líquido se llevaron a cabo en células H5 sembradas 24 h antes, subconfluentes y mantenidas a 27 °C, por adición directa del virus al medio de cultivo a multiplicidad de infección (mdi) de 0,01 a 2 (según el objetivo del experimento). Una vez alcanzado un efecto citopático (ecp) completo a los 3 días post infección (dpi), se recogió el sobrenadante de cultivo con los virus se almacenó a -70 °C.

Titulación: Cuando fue necesario se titularon las suspensiones virales como se ha descrito previamente (Carrascosa, 1994). Se sembraron 10⁶ células H5 en 2 ml de medio TC-100 suplementado con 10% de SF por cada pocillo de placa multipocillo M6, y se incubaron a 27 °C durante 1-2 h, hasta que la confluencia de la monocapa fue de aproximadamente un 40%. Se retiró el medio y se añadieron 0,4 ml por pocillo de la suspensión de baculovirus convenientemente diluida en medio TC-100, incubando a 27 °C durante 1 h, balanceando la placa cada 10 min. Sin retirar el inóculo, se añadieron 4 ml de medio de plaqueo recién preparado y atemperado a 37 °C en cada pocillo, y se dejó solidificar. El medio de plaqueo se obtuvo mezclando 1 volumen de agarosa de bajo punto de fusión (*Sea Plaque GTG agarose, BMA*) al 3% fundida y mantenida a 45 °C, y un volumen de medio TC-100 concentrado 2x y suplementado con 20% SF inactivado más 0,1 mg/ml de DEAE- dextrano. Las células se incubaron durante 6 días hasta alcanzar un ecp completo, se fijaron con 2 ml/pocillo de formaldehído al 2% durante 2 h y se tiñeron con cristal violeta al 1% en formaldehído al 5% durante 4 h. Se retiró la agarosa y se contaron las placas de lisis (unidades formadoras de placa, ufp). Las titulaciones se llevaron a cabo por duplicado.

3.1.5. Virus MVM, infección y titulación

El trabajo presentado en esta memoria se llevó a cabo utilizando la cepa de MVM fibrotrópica prototipo (p), suministrada por el Prof. J. M. Almendral.

Infección: Los virus de MVM se amplificaron infectando células NB324K según el protocolo utilizado en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Segovia et al., 1991; Rubio et al., 2001) con pequeñas modificaciones. Brevemente, la infección en medio líquido se realizó inoculando viriones (apartado 3.5.1) en monocapas subconfluentes de 2,5 x 10⁶ células NB324K en placas P100 con MVM a una mdi de 7 x 10⁻³. Los sobrenadantes de infección fueron recogidos una vez alcanzado un ecp completo (al cabo de 4 días) y almacenados a -70°C o procesados, según el caso.

Titulación: La titulación de MVM se llevó a cabo siguiendo un procedimiento previamente descrito (Tattersall y Bratton, 1983) y modificado en el laboratorio del Prof. J.

M. Almendral (Segovia et al., 1991), en el que se introdujeron algunas pequeñas modificaciones. Placas P60 sembradas con $4,4 \times 10^5$ células NB324K se lavaron con PBS completo (conteniendo iones Ca^{2+} y Mg^{2+}) (PBSc), y a continuación se añadieron 0,4 ml/P60 de diluciones seriadas de MVM en PBSc suplementado con 0,1% SF. Las placas se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación cada 15 min, retirando a continuación el inóculo por aspiración. Seguidamente se añadieron 6 ml/P60 de medio de paqueo mantenido a 37°C , preparado mezclando dos soluciones: solución 1, 45 ml: medio de cultivo DMEM concentrado 2x conteniendo 20% SF, 2,8 mM L-Gln, 0,88 mM aminoácidos no esenciales (L-Ala, L-Asn, L-Asp, L-Glu y L-Pro) y una mezcla de antibióticos (sulfato de estreptomicina a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y penicilina G a 200 U/ml); solución 2, 43 ml: agarosa al 1% en agua estéril, recién fundida y mantenida a 45°C . Las placas se incubaron a 37°C durante 7 días, y a continuación se fijaron las células con 2 ml/P60 de una solución acuosa de formaldehído al 2% durante 30 min. Tras retirar el medio de paqueo y el formaldehído, se tiñeron con una solución acuosa de cristal violeta al 1%, y formaldehído al 5% durante otros 30 min. Los títulos se determinaron por duplicado y se refirieron al control no mutado (wt) del mismo experimento. La capacidad para producir partículas infectivas se comprobó mediante *Western Blot* a 96 hpe (apartado 3.10.3), mientras que los valores de ufp/ml se normalizaron en función de la cantidad de proteína expresada, determinada por *Western Blot*, siguiendo el protocolo desarrollado por el grupo del Prof. J. M. Almendral (Grueso, 2006; Ventoso et al., 2010; Sanchez-Martinez et al., 2012) (apartado 3.10.3) (se está haciendo actualmente).

3.2. Plásmidos recombinantes

3.2.1. Plásmido pSVtk-VP1/2

Fue obtenido en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Ramirez et al., 1995). Tiene 5,8 Kb, codifica el gen de las proteínas VP1 y VP2 de MVMp y confiere resistencia a ampicilina.

3.2.2. Plásmido pFB1-VP2

Mide 5,8 Kb, contiene el segmento de ADN del genoma de MVMp que codifica para VP2 de MVMp y fue obtenido a partir del plásmido pSVtk-VP1/2 (Reguera et al., 2004). Confiere resistencia a gentamicina.

3.2.3. Bácmido BM-VP2

Se utilizó el plásmido pFB1-VP2 como donador para construir un bácmido recombinante que contuviera el gen de VP2 de MVMp (BM-VP2) y confiriera resistencia a kanamicina. Para su obtención se utilizó el sistema *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen)*, siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones (Castellanos, 2011). Brevemente, las mutaciones introducidas en el plásmido pFB1-VP2, mediante mutagénesis dirigida (apartado 3.3), se transfieren al bácmido (bMON14272) que está presente en las células DH10Bac gracias a la ADN transposasa (Luckow et al., 1993) expresada por el plásmido *helper* (pMON7124), presente en dichas células. Se transformaron de 150 a 200 ng pFB-VP2 en 40 µl de células DH10Bac electrocompetentes recién descongeladas como se ha descrito en el apartado 3.1.1. A continuación, se extendieron 50 µl de la suspensión en placas Petri que contenía medio LB sólido con 50 µg/ml kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina, 100 µg/ml del indicador *BluoGal (Gibco)* y 40 µg/ml de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, *Sigma*). Las placas se incubaron a 37 °C durante unas 18-20 h. Se seleccionaron varias colonias positivas (color blanco) que se aislaron directamente mediante extensión en zigzag en otra placa selectiva de las mismas características, incubándose del mismo modo para confirmar el color de las colonias elegidas. Se seleccionaron colonias blancas en 2 zigzags diferentes con las que se inocularon 10 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml de tetraciclina. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 12 h con agitación a 250 rpm. De dicho cultivo se obtuvo el bácmido mediante un procedimiento de lisis alcalina siguiendolas instrucciones del fabricante del sistema *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*. El ADN obtenido se disolvió en un total de 120 µl de agua estéril, se analizó por restricción con la enzima *ApaL I (NEB)* en gel de agarosa al 1% en TAE 1x a 80 v y se almacenó a 4 °C o a -20 °C en alícuotas.

3.2.4. Plásmido pTRp

Este plásmido infeccioso de 8,7 Kb contiene la secuencia de ADN correspondiente al genoma completo de MVMp. Fue obtenido en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Ramirez et al., 1995) como una modificación del clon infeccioso de MVMp, pMM984 (Merchinsky et al., 1983; Gardiner y Tattersall, 1988), originariamente suministrado por el Dr. P. Tattersall (Yale University). Confiere resistencia a ampicilina.

3.3. Mutagénesis dirigida

3.3.1. Procedimiento

Para introducir mutaciones en el gen que codifica para la VP1/VP2 de MVMp se llevó a cabo mutagénesis dirigida sobre los plásmidos pSVtk-VP1/2 y pFB1-VP2 mediante el método de PCR inversa, utilizando el kit *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron parejas de oligonucleótidos portadores de la mutación, de longitud comprendida entre 24 y 40 nucleótidos (Invitrogen) (Tabla 1). La presencia de las mutaciones deseadas se confirmó en todos los casos por secuenciación de un segmento de al menos 600 pares de nucleótidos alrededor del codón mutagenizado.

3.3.2. Introducción de mutaciones racionales en el clon infeccioso pTRp

Tras introducir las mutaciones en el plásmido pSVTK-Vp1/VP2 como se indica en el apartado anterior los segmentos que contenían las mutaciones puntuales se subclonaron en el plásmido infeccioso pTRp. Para ello se utilizaron los sitios XhoI y XbaI que delimitan la mayor parte de la secuencia completa del gen de la VP2 (posiciones 2071-4342). Para resolver problemas técnicos en el procedimiento del subclonaje en pTRp se contó con la ayuda experimental de la Lda. A. Rodríguez de nuestro laboratorio.

Primero se digirieron 5 µg de plásmido pTRp en un volumen total de 20 µl, utilizando 20 U de XbaI (Roche) y 40 U de XhoI (Roche) incubando a 37 °C durante una noche. Los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Gibco) al 1% en tampón TAE 1X. Las bandas obtenidas tras la digestión fueron de aproximadamente 6,5 Kb y 2,3 Kb. El fragmento correctamente cortado y carente del inserto a sustituir (6,5 Kb) se purificó mediante el kit *PCR Prep* (Promega).

La obtención del segmento de VP2 mutante a introducir en pTRp se llevó a cabo digiriendo, en un volumen total de 20 µl, 2 µg de plásmido pSVtk-VP1/2 con 20 U de XbaI (Roche) y 40 U de XhoI (Roche) e incubando a 37 °C desde toda la noche. Los fragmentos obtenidos (3,5 Kb y 2,3 Kb) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Gibco) al 1% en tampón TAE 1X. El fragmento que contenía el segmento mutado a reemplazar en pTRp (2,3 Kb) se purificó mediante el kit *PCR Prep* (Promega) y fue concentrado mediante evaporación en vacío hasta una concentración mínima de 100-150 ng/µl.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la introducción de mutaciones en VP2.

Mutación	Secuencia ^a
R54A-F	5'-CAAACGCATTAT <u>GCA</u> TTCTTGGGTGAC-3'
F55A-F	5'-CGCATTATAGAG <u>GC</u> TTGGGTGACGGCTGG-3'
D58A-F	5'-GATTCTTGGGT <u>GCC</u> GGCTGGGTAG-3'
W60A-F	5'-CTTGGGTGACGGC <u>GCG</u> GTAGAAATTACTGC-3'
H72A-R	5'-GCAACTAGACTAGTAG <u>GCT</u> TTAAACATGCCTAAATC-3'
R83A-F	5'-CAGAAAACATTATGC <u>GCA</u> ATCAGAGTTCACAATACAAC-3'
I84A-F	5'-CAGAA AACTATTGCAGAG <u>CC</u> CAGAGTTCACAATACAAC-3'
L113F-F	5'-GGACACCATGGAGCT <u>TT</u> CGTGGATGCTAATGC-3'
D115A-F	5'-CCATGGAGCTTGGTGG <u>CT</u> GCTAATGCTTGGGG-3'
Q137K-F	5'-CAACACCATGAGC <u>AAG</u> CTTAACCTTGGTATC-3'
L143F-F	5'-GAGCCAGCTTAACCTTGGTATCA <u>TTT</u> GATCAAGAAATATTC-3'
E146A-F	5'-CACTTGATCAAG <u>GCG</u> ATATTCAATGTAGTGC-3'
E146D-F	5'-CACTTGATCAAG <u>GAC</u> ATATTCAATGTAGTGC-3'
E146Q-F	5'-GGTATCACTTGATCAAG <u>CAG</u> ATATTCAATGTAGTGC-3'
S182H-F	5'-GATGGTTGCAGTAGAC <u>CACA</u> ACAACATTTTGCC-3'
N183A-F	5'-GGTTGCAGTAGACTCAG <u>CCA</u> ACATTTTGCCATAC-3'
K204A-F	5'-GGTTTCTACCCCTGGG <u>GCA</u> CCAACCATAGC-3'
I207A-F	5'-CCCTGGAAACCAACC <u>GCA</u> GCATCACCATACAGG-3'
K241A-F	5'-GTGATGGGAACACCAG <u>GCA</u> GGAATGAATTCTC-3'
Q255R-F	5'-GAGAACACACAAC <u>CGA</u> ATCATTGCTCAG-3'
T257K-F	5'-CACACAACAAATC <u>AAA</u> TTGCTCAGAACAGG-3'
D263A-F	5'-CTCAGAACAGGGG <u>GCC</u> GAATTTGCCAC-3'
D263E-F	5'-CAGAACAGGGG <u>GAG</u> GAATTTGCCAC-3'
D263N-F	5'-GCTCAGAACAGGGG <u>AAT</u> GAATTTGCCACAGG-3'
E264A-F	5'-GAACAGGGGAC <u>GCA</u> TTTGCCACAGG-3'
E264D-F	5'-GAACAGGGGAC <u>GAC</u> TTTGCCACAGG-3'
E264Q-F	5'-GAACAGGGGAC <u>CAG</u> TTTGCCACAGG-3'
T267A-F	5'-GGGGACGAATTTGCC <u>GCA</u> GGCACTTACTAC-3'
N275K-F	5'-CTACTTTGACACA <u>AAG</u> CCAGTTAAACTCACAC-3'
K471A-F	5'-GGACAAATATGGGAC <u>GCA</u> GAACTAGATCTTGAAC-3'
E472A-F	5'-CAAATATGGGACAAA <u>GCG</u> CTAGATCTTGAAC-3'
D474A-F	5'-GGGACAAAGAACTAG <u>GCT</u> CTTGAACACAAACC-3'
K478A-F	5'-GATCTTGAACAC <u>GCA</u> CCTAGACTTCAC-3'
R480A-F	5'-GAACACAAACCT <u>GCA</u> CTTCACATAACTGC-3'
K490A-F	5'-CTCCATTTGTTTGT <u>GCA</u> AACAATGCACC-3'
N491A-F	5'-GCTCCATTTGTTTGTAA <u>GCC</u> AATGCACCTGGAC-3'
D507A-F	5'-GGACCAAACCTAACT <u>GCC</u> CAATATGATCC-3'
S550A-F	5'-GTGTACCAAGTAG <u>GCT</u> GCTGAAGACAATGGC-3'
N554A-F	5'-GTAAGTGCTGAAGAC <u>GCT</u> GGCAACTCATACATG-3'
D263N-E264Q-F	5'-GCTCAGAACAGGGG <u>AACCAG</u> TTTGCCACAGGCAC-3'
D263E-E264D-F	5'-GCTCAGAACAGGGG <u>GAGGAC</u> TTTGCCACAGGCAC-3'

^aSubrayado y en negrita se señala el codón mutagenizado en cada caso. Cuando se construyeron dobles o triples mutantes se utilizó el ADN molde que contenía ya una o dos de las mutaciones, y sobre este se introdujo la segunda mutación.

Tras comprobar la pureza y concentración de los fragmentos obtenidos en otro gel de agarosa (*Gibco*) al 1% se ligaron vector e inserto. Se mezcló el volumen necesario para añadir 100 ng ($\approx 1 \mu\text{l}$) de vector y el resto de volumen hasta 10 μl de inserto, de forma que se consiga la mayor relación molar vector:inserto posible. Se añadió 1 U de ADN ligasa de T4 (*Roche*) y se incubó a 16 °C toda la noche. A continuación se electroporaron células *E.*

coli JC8111 electrocompetentes tal y como se describe en el apartado 3.1.1 y se seleccionaron varias colonias que se crecieron en 10 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C y 250 rpm durante una noche. De dicho cultivo se obtuvo el ADN plasmídico utilizando el Kit *Wizard minipreps* (Promega). El plásmido obtenido se identificó como pTRp mediante análisis de restricción con XhoI y XbaI. La presencia de las mutaciones introducidas en todos los casos se confirmó mediante secuenciación de un segmento de al menos 600 pares de nucleótidos alrededor del codón mutagenizado.

3.4. Obtención de baculovirus recombinantes, expresión de VP2 y producción de VLPs de MVM en células de insecto

3.4.1. Transfección de células H5 con el bácmido BM-VP2

Para la transfección se preparó mezcló 1,5 µg de la preparación de bácmido BM-VP2 purificado por lisis alcalina con 6 µl de *Plus-Reagent* (Invitrogen) y medio TC-100 (Gibco) sin suero hasta un volumen final de 100 µl. A continuación se incubó la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente (t.a.), mientras por otro lado, se diluyeron 6 µl de *Lipofectamine Transfection Reagent* (Invitrogen) en 94 µl de medio TC-100 sin suero. Ambas mezclas se juntaron e incubaron otros 15 min a t.a., antes de añadir 0,8 ml de medio TC-100 sin suero, para obtener la mezcla de transfección completa (1 ml).

Se utilizaron células H5 procedentes de monocapas subconfluentes con una viabilidad superior al 95% para la transfección. Se sembraron en placas M6 3 x 10⁵ células en 2 ml de medio TC-100, suplementado tal y como se describe en el apartado 3.1.2. Luego se incubaron durante 1 h a 27 °C, quedando a una confluencia aproximada del 40%. Tras retirar el medio de cultivo, las células se lavaron con 2 ml de medio TC-100 sin suero y se añadió toda la mezcla de transfección (1 ml). Las células se incubaron durante 5 h a 27 °C. A continuación se retiró el medio, se añadieron 2 ml de TC-100 suplementado y se incubó a 27 °C hasta alcanzar un ecp completo (6 o 7 días). Se recogió la suspensión de células en el propio medio de cultivo y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a 4 °C. Tras la centrifugación se obtuvo i) el sobrenadante (denominado pase 0), fuente de baculovirus recombinantes, y ii) las células, que volvieron a centrifugarse en PBS en las mismas condiciones anteriores, siendo el sedimento de ésta segunda centrifugación convenientemente resuspendido en 100 µl de PBS para el posterior análisis de la expresión de la proteína VP2 mediante electroforesis desnaturalizante en gel de

poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) seguida de inmunoensayo (apartado 3.10.1 tras extraer las proteínas intracelulares mediante 3 ciclos sucesivos de congelación (-20 °C) y descongelación (37 °C), y posterior centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C.

3.4.2. Amplificación de baculovirus recombinantes

Se infectaron ($mdi = 0,01$) células H5 crecidas en monocapa en botellas B175 o placas P150 hasta aproximadamente un 70% - 80% de confluencia, con los baculovirus recombinantes de pase 0 obtenidos como se describe en el apartado anterior. Las células se incubaron a 27 °C durante 3 días, se recogieron en el sobrenadante de cultivo y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante que contenía los baculovirus recombinantes del pase 1 se tituló si fue necesario (obteniéndose generalmente títulos del orden de 10^7 ufp/ml) y almacenó a -70 °C. Cuando se necesitó incrementar el título de baculovirus en el sobrenadante, se realizaron ampliificaciones sucesivas del mismo modo que hemos descrito.

3.4.3. Purificación de VLPs producidas en células de insecto

Se llevó a cabo según el procedimiento previamente descrito por el grupo del Prof. J. M. Almendral (Hernando et al., 2000), con pequeñas modificaciones. Sobrenadantes infectivos de pase 2, obtenidos como se indica en el apartado anterior, se utilizaron para infectar ($mdi = 2$) células H5 crecidas al 80 % de confluencia en botellas B175 o cajas de 500 cm². A continuación se incubaron a 27 °C durante 3 días hasta un ecp completo y una máxima eficiencia en la síntesis de VP2. Las células se recogieron en su propio medio de cultivo con raspador (*Cell Lifter*, Costar) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. El sedimento celular se resuspendió en un volumen de PBS similar al original y se repitió la centrifugación anterior. El nuevo pellet se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,2% Tritón X-100, 0,5 mM EDTA) y a continuación se lisaron las células utilizando un sonicador (MK2, MSE) con punta cónica de unos 4 mm de diámetro, realizando 6 pulsos de 16-18 µm de amplitud y 15 s de duración, con descansos de 30 s, manteniendo la muestra sumergida en hielo.

El extracto sonificado se centrifugó en rotor JA 25.50 (*Beckman*) a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. A continuación el sobrenadante fue depositado en un colchón de sacarosa al 20% en PBS y se centrifugó en rotor SW40 (*Beckman*) a 16.000 rpm durante 21,5 h a 10 °C. El sedimento obtenido fue resuspendido en 0,5 ml de PBS toda la noche. Tras esto, la muestra se depositó en un gradiente de sacarosa del 10% al 40% en PBS (12 ml), y se centrifugó a 30.000 rpm durante 5,5 h a 10 °C. Los gradientes se fraccionaron

tomando alícuotas de 0,5 ml, y las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE tal y como se describe en el apartado 3.10.1. Las fracciones con VLPs libres de contaminantes se mezclaron y dializaron exhaustivamente frente a PBS a 4 °C, para, por último, concentrarlas usando un *Amicón Ultra-4 centrifugal filter* 100 NMWL (Millipore) antes de guardarlas a 4 °C. La pureza y concentración de las VLPs purificadas se determinaron mediante SDS-PAGE, utilizando para la calibración de la concentración diferentes cantidades de seroalbúmina bovina (BSA). Además, se analizaron las preparaciones de VLPs al microscopio electrónico (ME) por tinción negativa, tal y como se describe en el apartado 3.12.

3.5. Expresión de VPs y producción de cápsidas vacías y viriones de MVM en células de mamífero

3.5.1. Electroporación de células NB324K con los plásmidos pSVtk- VP1/2 o pTRp

Se llevó a cabo siguiendo el protocolo utilizado en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Lombardo et al., 2000; Lombardo et al., 2002) con pequeñas modificaciones. Células NB324K obtenidas de monocapas subconfluentes, tripsinizadas y sedimentadas en centrífuga de mesa a 1.500 rpm durante 5 min, se resuspendieron a una concentración de 2×10^7 células/ml o 4×10^6 células/ml (para los ensayos de inmunofluorescencia (IF) indirecta con el plásmido pSVtk-VP1/2) en DMEM al 5% SF frío. Tras 30 min en hielo se mezcló el plásmido a electroporar (2 µg de pSVtk-VP1/2 para IF indirecta o 10 µg de pTRp o pSVtk-VP2/1 para producción de cápsidas o viriones), con 20 µg de ADN de esperma de gamba (*Roche*) y DMEM al 5% SF frío hasta un volumen total del 40 µl. A continuación se añadieron 150 µl de la suspensión de células NB324K (3×10^6 células para producir partículas, o $0,6 \times 10^6$ para la IF con pSVtk-VP1/2) y 10 µl de solución 1,5 M NaCl. Los componentes se mezclaron rápidamente a t.a. y se pasaron a una cubeta de electroporación de 0,4 cm de separación entre electrodos (*Bio-Rad*) también a t.a. Se dio un pulso de 250 v, 450 µF en el modo “*High capacitance*” en un electroporador *Gene Pulser II* (*Bio-Rad*). Los tiempos de electroporación obtenidos fueron alrededor de 20 ms con $0,6 \times 10^6$ células y de unos 12 ms con 3×10^6 células. La suspensión de células electroporadas se diluyó rápidamente en i) 10 ml de DMEM 10% SF a 37 °C, sembrándose en una placa P100 (para electroporaciones de 10 µg de plásmido) o ii) en 2 ml de DMEM 10% SF a 37 °C, sembrándose en un pocillo de placa M24 que contenía cubreobjetos de 12 mm de diámetro (*Menzel-Gläser*) (esterilizados previamente durante 1 h con etanol absoluto

(Merck)) para las electroporaciones de 2 µg de las IFs. Tras 24 h a 37 °C se retiró el medio de cultivo mediante aspiración y añadió DMEM al 5% SF. Las células de las M24 se incubaron a 37 °C y se fijaron a las 48 horas post electroporación (hpe) para proceder a los ensayos de IF. Las P100 se incubaron a 37 °C durante 72 hpe (si se trataba de obtener cápsidas vacías por expresión del plásmido pSVtk-VP2/1) o 96 hpe (para obtener sobrenadantes de infección con virus extracelulares).

La comparación de la viabilidad de viriones mutantes frente al control no mutado se llevó a cabo realizando transfecciones como se ha descrito en este apartado y a continuación se determinó el título de viriones producidos a las 96 hpe como se describe en el apartado 3.1.5. En todos los experimentos se introdujo un control positivo interno utilizando el ADN no mutado y se utilizó la misma cantidad de ADN purificado para cada mutante y para el control, determinada mediante electroforesis en geles de agarosa.

3.5.2. Purificación a escala analítica de cápsidas vacías

Se realizó siguiendo el protocolo del grupo del Prof. J. M. Almendral (Segovia et al., 1991) con algunas modificaciones menores.

Para obtener cápsidas vacías a partir de pSVtk-VP2/1 (ver apartado anterior) se partió de células NB324K transformadas por electroporación con ese plásmido. Tras lavar las monocapas celulares con PBS a 4 °C, las células fueron recogidas con raspador (*Cell Lifter*, Costar) en PBS y centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se tomó el sedimento que se congeló a -20 °C toda la noche. Al día siguiente se resuspendió en 5 ml de tampón TE (Tris 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8) + 0,2% SDS a 4 °C, se incubó durante 5 min a t.a. y se lisaron las células mediante 3 ciclos sucesivos de congelación (-20 °C) y descongelación (37 °C). A continuación, el lisado celular fue sonificado (*sonicador MK2*, MSE) con una punta cónica de unos 4 mm de diámetro, realizando 6 pulsos de 16-18 µm de amplitud y 15 s de duración, separados entre sí por intervalos de 30 s, con la muestra sumergida en hielo. Tras esto, se centrifugó el extracto sonificado en rotor JA 25.50 (*Beckman*) a 8.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante (uno 5 ml) fue depositado sobre 3-4 ml de colchón de sacarosa al 20% (20% Sacarosa, 50 mM Tris pH 8, 20% sacarosa, 1 mM EDTA (pH 8), 0,1 M NaCl) y se centrifugó a 15 °C en el rotor SW40 (*Beckman*) durante 18 h a 15.500 35.000 rpm. Al sedimento se le añadió 1 ml de TE conteniendo 0,2% Sarkosyl (*Sigma*) tras incubarlo toda la noche a 4 °C, y se resuspendió mediante el paso repetido a través de una aguja 22 G conectada a una jeringa hipodérmica. A continuación, la mezcla se depositó sobre un gradiente de CsCl preparado a partir de

una solución de índice de refracción ajustado a 1,380 g/ml, en un volumen total de 10 ml. Se centrifugó en rotor TFT 75.13 a 50.000 rpm durante 24 h a 15 °C. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y analizaron por hemaglutinación (HA) (apartado 3.11). Las fracciones con cápsidas se mezclaron, dializaron exhaustivamente frente a PBS y concentraron usando un *Amicon Ultra-4 centrifugal filter* 100 NMWL (Millipore), siguiendo esencialmente las recomendaciones del fabricante. Finalmente se almacenaron a 4 °C. Para excluir la presencia de viriones en las cápsidas purificadas repitió todo el procedimiento desde el gradiente de CsCl.

Cuando resultó conveniente, las partículas purificadas se analizaron y cuantificaron al ME mediante tinción negativa tal y como se describe en el apartado 3.12.

3.5.3. Purificación a escala preparativa de viriones

Para la producción a gran escala viriones MVMp se infectaron 3 P100s con células NB324K subconfluentes ($\approx 3 \times 10^6$ células/P100). Se lavaron las monocapas celulares con PBSc, se añadió el inóculo viral ($\text{mdi} = 7 \times 10^{-3}$) diluido en PBSc suplementado con 0,1% de SF y se incubó a 37 °C durante 1 h en agitación. A continuación se retiró el inóculo, se añadieron 10 ml de DMEM al 5% de SF a cada P100 y se incubaron las células durante 5 h más. Pasado este tiempo se recogieron las células infectadas mediante tripsinización y se sembró un subcultivo de 20 P100s, que se incubaron hasta alcanzar ecp completo ($\approx 4\text{-}5$ dpi). Posteriormente todas las células infectadas fueron recogidas con raspador (*Cell Lifter*, *Costar*) en el propio medio de cultivo, y centrifugadas a 5.000 rpm durante 15 min a 4 °C en rotor GS-3 (*Sorvall*). Tras la centrifugación se obtuvo: i) el sedimento celular, que se resuspendió en 15 ml de tampón TE + 0,2% SDS durante 5 min a t.a. y lisado mediante 3 ciclos sucesivos de congelación (-70 °C) y descongelación (37 °C), para extraer los virus intracelulares; este lisado se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 min a 4 °C (rotor JLA 10.500 (*Beckman*)), y se recogió el sobrenadante. ii) el sobrenadante (que contenía virus en suspensión) al que se añadió PEG6000 hasta una concentración de 3,4% y NaCl hasta una concentración final de 0,5 M, dejando actuar la mezcla a 4 °C toda una noche, antes de volver a centrifugar en el mismo rotor a 5.000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sedimento de esta última centrifugación se resuspendió en 5 ml de tampón TE a 4 °C.

Se mezclaron las suspensiones virales obtenidas en los pasos i) y ii), se les añadió SDS hasta una concentración final del 0,5% y se depositó la mezcla sobre 3,5 ml de colchón de sacarosa al 20% (20% Sacarosa, 50 mM Tris pH 8, 20% sacarosa, 1 mM EDTA pH 8, 0,1 M NaCl). Se centrifugó a 10 °C en un rotor SW40 (*Beckman*) durante 5,5 h a 35.000 rpm. Al

sedimento se le añadió 1 ml de TE conteniendo 0,2% Sarkosyl (Sigma), y tras 2 h se resuspendió con jeringa y aguja de 22 G, dejándolo a 4 °C toda una noche. A continuación, la mezcla se depositó sobre un gradiente de cloruro de cesio obtenido de una solución de índice de refracción 1,380 g/ml, en un volumen total de 10 ml. Se centrifugó a 50.000 rpm durante 24 h a 15 °C en rotor TFT. 75.13 (Beckman). Se tomaron fracciones de 0,5 ml y analizaron por HA (apartado 3.11). Finalmente, aquellas fracciones que tenían viriones se dializaron exhaustivamente frente a PBS, se concentraron usando un *Amicon Ultra-4 centrifugal filter* 100 NMWL (Millipore) según las especificaciones del fabricante y se almacenaron a 4 °C. Para asegurar la ausencia de cápsidas en los viriones purificados se repitió todo el procedimiento desde el gradiente de CsCl. Cuando fue necesario las muestras se visualizaron y cuantificaron al ME tal y como se describe en el apartado 3.12.

3.6. Obtención de sueros policlonales contra VPs desnaturalizadas de MVM

Para el análisis de la expresión de VPs y formación de cápsidas mediante inmunofluorescencia *in situ* se utilizó un suero policlonal antiVPs desnaturalizadas producido en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral, así como un suero de las mismas características producido en nuestro laboratorio. Para ello se siguió el protocolo descrito en (Hernando, 1999) con algunas modificaciones: Brevemente: una preparación de VPs (entre 100 y 200 µg) desnaturalizadas y preparadas como se explica en el apartado 3.10.2 se emulsionó con adyuvante completo (primera inyección) o incompleto (3 inyecciones restantes) de Freund's (Sigma) e inyectó en conejos a intervalos de dos semanas. Quince días tras la cuarta inyección se desangró a los conejos y purificó el suero sanguíneo por centrifugación a 4000 rpm 10 min a 4 °C.

3.7. Análisis de la expresión de VPs y ensamblaje de cápsidas de MVM mediante inmunofluorescencia *in situ*

Se llevó a cabo siguiendo los protocolos utilizados en el laboratorio del Prof. J. M. Almendral (Lombardo et al., 2000; Lombardo et al., 2002), con ligeras modificaciones. Se transformaron células NB324K con pSVtk-VP1/2 (apartado 3.5.1) y sembraron en placas multipocillo M24 o M6 con cubreobjetos en su interior. Éstos se lavaron con PBSc frío tres veces durante 10 min antes de fijar las células añadiendo 1 ml de mezcla 1:1 de metanol:acetona (Merck), enfriada a -20 °C e incubando a -20 °C durante 10 min. A continuación se retiró el líquido y las células se rehidrataron con PBSc tres veces durante 10 min, bloqueando a continuación con PBSc con 20% SF a t.a. durante 10 min. Tras esto

se realizaron dos lavados de 10 min con PBSc. Los cubres se depositaron sobre una gota de 40 μ l de solución de anticuerpos primarios en PBSc en una cámara húmeda y se incubaron en estufa de 37 °C durante 1 h.

Como anticuerpos primarios se utilizaron: i) un suero policlonal de conejo que reconoce proteínas de la cápsida de MVM independientemente de su estado de asociación (anti-VPs desnaturalizadas), diluido 1/400 suministrado por el Prof. J.M. Almendral, o un suero similar obtenido en nuestro laboratorio (apartado 3.6) ii) un anticuerpo monoclonal (B7A) de ratón, suministrado por el Prof. J.M. Almendral, originalmente cedido por el Dr. C. Parrish (Cormell University). B7A reconoce específicamente partículas de MVMp ensambladas (viriones, cápsidas vacías y VLPs) (Lopez-Bueno et al., 2003) y se utilizó diluido 1/400 o 1/200. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBSc durante 10 min, se volvieron a depositar en la cámara húmeda y se incubaron con una solución de anticuerpos secundarios como se hizo para los anticuerpos primarios. Como anticuerpos secundarios se utilizaron: Alexa 594 y Alexa 488 (*Invitrogen*), diluidos 1/1000 en PBSc. Por último, los cubreobjetos se lavaron tres veces más con PBSc durante 5 min, se enjuagaron con agua destilada y etanol absoluto, se dejaron secar y montaron sobre portaobjetos utilizando 7 μ l de Mowiol (*Polysciences*) y dejando secar al menos 24 h. Para su conservación los portaobjetos montados se almacenaron a 4 °C en oscuridad. Las preparaciones se visualizaron en microscopio vertical de fluorescencia Axioskop (*Zeiss*) acoplado a una cámara CCD-monocroma y color (*Roper Scientific*) y se procesaron las imágenes obtenidas utilizando el programa Metavue 5.07 (*Universal Imaging Corporation*).

3.8. Análisis mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos de transiciones conformacionales y disociación de VLPs de MVM inducidas por calor

Se siguieron básicamente los protocolos descritos en (Carreira et al., 2004; Reguera et al., 2004) con VLPs obtenidas según lo descrito en el apartado 3.4.3. Se utilizó un espectrofluorímetro *Cary Eclipse* (*Varian*) equipado con una unidad de control de temperatura tipo *Peltier*. La cubeta de fluorescencia presentaba trayectorias ópticas de excitación y emisión de 2 y 10 mm respectivamente. El volumen de muestra utilizado fue de 0,3 ml, a una concentración de proteína de 0,5 μ M. Para evitar que la presencia de burbujas causara posibles artefactos, tanto la muestras como el tampón de dilución (PBS) se degasificaron previamente. Los parámetros de medida fijados en el programa de control (*Cary Eclipse, Thermal Scan*), fueron: longitud de onda de excitación 295 nm,

longitud de onda de emisión 330 nm. El gradiente térmico se realizó desde 25 °C a 80 °C, a una velocidad de 1 °C/min, e intervalos de 1 min entre mediciones. Para corregir la pequeña diferencia entre la temperatura recogida por el bloque y la temperatura real de la muestra se aplicó un factor de corrección de 0,9705 (Carreira et al., 2004). Los datos de intensidad de fluorescencia a 330 nm (unidades arbitrarias) para cada temperatura (°C) se ajustaron a una transición sigmoideal cooperativa mediante el programa *KaleidaGraph* (Abelbeck Software) para obtener el valor de la temperatura media (T_m) de transición en °C (Castellanos, 2011).

3.9. Cinéticas de inactivación térmica de viriones de MVM

Se calentaron en un termobloque, a temperaturas entre 50 °C y 90 °C (según el experimento), durante tiempos variables entre 0 min y 240 min los sobrenadantes infecciosos obtenidos a 96 hpe apartado 3.1.5) diluidos en medio PBSc + 0,2% SF (hasta 10^5 pfu/ml). Los viriones infecciosos remanentes a cada tiempo tras el calentamiento se titularon como se describe en el apartado 3.1.5. Todos los experimentos incluyeron un control no mutado, contenían réplicas intraexperimento y se hicieron por duplicado. Las cinéticas de inactivación térmica obtenidas se ajustaron a una curva de decaimiento exponencial [Ecuación 1]) mediante el programa *Kaleidagraph*:

$$T = T_{inf} + T_0^{(-k*t)} \quad \text{[Ecuación 1]}$$

T es el título viral a tiempo t ; T_{inf} es el título viral a tiempo infinito, T_0 es el título viral a tiempo 0 y k es la velocidad de la reacción que nos interesa conocer. En los casos apropiados se fijó el valor $T_{inf} = 0$. El valor de k obtenido para cada mutante se normalizó frente al valor de k obtenido para el control no mutado en el mismo experimento.

3.10. SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de proteínas

3.10.1. SDS-PAGE analítica

El análisis de la pureza de preparaciones de partículas de MVM, la localización de las fracciones procedentes de gradientes de CsCl que contenían VLPs ensambladas y la estimación de la concentración de proteínas virales se realizaron mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La muestra se mezcló en proporción adecuada con tampón de ruptura (Tris-HCl pH 6,8 0,1 M, glicerol 8,3% v/v, SDS 3,3%, β -mercaptoetanol 4%, azul de bromofenol 0,16 mg/ml), se incubó a 98 °C durante 5 min y se cargó en geles con un

porcentaje de acrilamida del 8-10% (según el caso) para correr la electroforesis a 25-30 mA. Cuando procedió, los geles se tuvieron 1 h en solución de tinte [2% de azul *Coomassie* (*Bio-Rad*), 24% etanol (*Merck*), 10% ácido acético glacial (*Merck*) y agua destilada], luego 30 min en solución de destintado [24% etanol (*Merck*), 10% ácido acético glacial (*Merck*) y agua destilada] y finalmente se conservaron en solución de fijado [10% ácido acético glacial (*Merck*) en agua destilada].

3.10.2. SDS-PAGE preparativa

Para obtener grandes cantidades de VP2 parcialmente purificada (empleadas para la obtención de anticuerpos, apartado 3.6) se siguió básicamente el protocolo explicado en el apartado anterior, con modificaciones menores que se indican a continuación: Se utilizó un gel al 10% de acrilamida de mayor tamaño (14 x 16 cm), para poder correr la mayor cantidad de muestra posible. El gel corrió durante aproximadamente 4 horas a 35 mA y al finalizar se tiñó con azul de *Coomassie* (*Bio-Rad*) al 0,25 % en agua destilada 30 min. El fragmento de gel conteniendo la banda de VP2 se recortó, se destintó lavando 50 min en agua destilada, y se emulsionó en PBS utilizando un homogeneizador tipo *Potter-Elvehjem*. Tras centrifugación, el líquido conteniendo la proteína soluble se congeló y guardó a -20 °C hasta su utilización.

3.10.3. Inmunoelectrotransferencia

Para la inmunodetección de proteínas de la cápsida de MVM mediante *Western Blot* separadas por SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron desde el gel a membrana de nitrocelulosa (NC) (*Bio-Rad*) utilizando un sistema electrotransferencia (*Bio-Rad*), y realizando la misma durante 1 h a 300 mA a 4 °C. La NC se incubó con leche desnatada en polvo (*Nestlé*) al 5% en PBS+0,1% Tween-20 (*Sigma*) durante 1 h a t.a. en agitación. Para la inmunodetección cuantitativa se utilizó un suero policlonal de conejo que reconoce las proteínas de la cápsida de MVM, independientemente de su estado de asociación (suero anti-VPs) (Grueso, 2006; Ventoso et al., 2010; Sanchez-Martinez et al., 2012). La NC se incubó durante 1 h a t.a. con el suero anti VPs, diluido 1/5000 en PBS-T con leche al 5%. A continuación se lavó la NC 3 veces durante 15 min con PBS-T. Seguidamente, se añadió el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (*Anti-Rabbit IgG* (*Goat*), *HRP-Labeled GE Healthcare*) diluido 1/5.000 en PBS- T con leche al 5%, y se incubó a t.a. durante 1 h. Se lavó de nuevo 3 veces durante 15 min con tampón de lavado y se reveló con el *kit ECL* (*GE Healthcare*). Para ello, se mezclaron los reactivos de revelado en relación 1:1 y se añadieron a la membrana de NC, incubando 1 min en oscuridad. El revelado se hizo

utilizando autorradiografías o con una cámara de autorevelado *ImageQuant LAS 4000 mini* (GE Healthcare).

Cuando fue necesario cuantificar la intensidad de las bandas tanto en geles de SDS-PAGE como en autorradiografías, se utilizó un densitómetro *GS-800* (Bio-Rad) y el programa de análisis *Quantity One 1-D Análisis* (Bio-Rad).

3.11. Determinación de actividad hemaglutinante de partículas de MVM

Las partículas de MVM son capaces de interaccionar con proteínas de superficie de eritrocitos (Spalholz y Tattersall, 1983) provocando la aglutinación de estos. Para detectar y cuantificar partículas de MVM mediante ensayos de hemaglutinación (HA) se siguió el protocolo descrito por el grupo del Prof. J. M. Almendral (Hernando et al., 2000). Se utilizó 1 ml de sangre de ratón adulto (cepa *Swiss*) con 1% de heparina, que se lavó con 45 ml de PBS, recogiendo las células mediante centrifugación a 4 °C en centrífuga de mesa durante 8 min a 2.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y los eritrocitos se diluyeron en PBS hasta el 2%. En placas multipolcillo M96 de fondo en U (*Nunc*) se aplicaron 2-50 µl de las muestras en la primera fila en un volumen total de 100 µl y se hicieron diluciones seriadas 1:2 en cada columna. A cada pocillo se añadió la mezcla de eritrocitos al 2% y se mantuvo la placa al menos 1 h a 4 °C en oscuridad, al cabo de los cuales se determinó la dilución límite para HA positiva.

3.12. Microscopía electrónica (ME)

Las partículas víricas se fijaron por deposición durante 4 min sobre rejillas de cobre de 200-300 huecos por pulgada, recubiertas de colodión y carbono e ionizadas (*G300-Cu*, *Gilder*). Las rejillas se lavaron tres veces en agua tridestilada y las muestras se tiñeron con acetato de uranilo al 2% (*Fluka*) durante 45 s. Las preparaciones se observaron al microscopio electrónico de transmisión (*JEOL*, *JEM-1010*), tomando fotografías desde 40.000 hasta 125.000 aumentos, utilizando las cámaras *Bioscan 792* (*Gatan*) y *TemCam-F416* (*TVips*) acopladas al microscopio, y los programas *Digital Micrograph* (*Gatan*) y *ME-MENU4* (*TVips*), respectivamente.

3.13. Microscopía de Fuerzas Atómicas

Los procedimientos que hemos utilizado para visualizar y determinar propiedades mecánicas de partículas de MVM fueron desarrollados y utilizados originalmente por el Dr.

P.J. de Pablo, y la Dra. C. Carrasco de su grupo de investigación. Como parte de la colaboración entre el grupo del Dr. De Pablo y el nuestro, estos procedimientos han sido utilizados extensamente por las Dras. M. Castellanos y R. Pérez en nuestro grupo; en esta Tesis hemos seguido en detalle los procedimientos que nos han transmitido estas investigadoras (Castellanos, 2011). Para todas los análisis se utilizó un AFM con elementos mecánicos cedidos generosamente por el Prof. J. Gómez-Herrero y electrónica de control comercial *Dulcinea* de la casa *Nanotec Electrónica*.

3.13.1. Preparación del soporte de vidrio

Para adsorber las partículas víricas se utilizaron cubreobjetos redondos *Menzel-Gläser* (24 mm de diámetro), previamente limpiados y silanizados del modo siguiente: se preparó una solución 9 M de KOH (*Merck*), y a continuación se añadieron a 35 ml de esta solución 300 ml de etanol absoluto (*Merck*). Los vidrios se colocaron en un portavidrios especial (diseñado por la Dra. C. Carrasco y fabricado por Segainvex, UAM) en el que se mantienen durante todo el protocolo. Se sumergieron en una cubeta de vidrio (*Dismadel*) que contenía la disolución anterior y se sonicaron en baño de ultrasonidos (*P. Selecta Ultrasons*) durante 5 min. A continuación se hicieron 3 lavados de 5 min con agua destilada, sonicando del mismo modo cada vez. Por último, se retiró exceso de agua posando el canto sobre un papel de filtro, y se incubaron en una estufa a 110 °C durante 10 min. Los vidrios limpios se mantuvieron en seco toda la noche en una cubeta limpia que contenía en su fondo 2 ml de hexametildisilazano (HMDS; *Sigma-Aldrich*). Los vidrios así preparados se guardaron en una placa Petri sellada con parafilm a t.a.

3.13.2. Preparación de la muestra

Las preparaciones de partículas víricas se diluyeron en PBS hasta una concentración adecuada para medir la muestra, que generalmente se fijó en unas 20-40 partículas por campo de 2000 nm².

Se inmovilizó un cubreobjetos de vidrio silanizado (ver apartado anterior) sobre un dispositivo para el análisis mediante AFM de muestras líquidas (denominado *piscina*), utilizando un mínimo de grasa de alto vacío (*Dow Corning Corporation*) o (en análisis más recientes) por otro agente sellador, *Thin Pour (Reprorruber)*. A continuación se depositó la muestra de interés (20 µl de la dilución apropiada) sobre el vidrio, y se incubó durante 30 min a t.a. Transcurrido este tiempo, se hicieron 4 lavados con 20 µl PBS sin tocar el vidrio, secar la muestra o distorsionar la gota. Finalmente se añaden entre 40 y 100 µl de PBS obteniendo un volumen final de muestra antes de empezar las medidas fue de 60-120 µl.

Para reponer el volumen de líquido parcialmente evaporado durante el proceso de medida se utilizó agua destilada.

3.13.3. Calibración de la micropalanca

Las micropalancas utilizadas en todos los experimentos de AFM fueron siempre *Olympus OMCL-RC800PSA* de 0,1 N/m de constante elástica (k_c). Sin embargo este valor nominal proporcionado por el fabricante (*Olympus*) no siempre coincide con el real, por lo que cada palanca utilizada se calibró siguiendo el método de Sader (Sader et al., 1999; Carrasco et al., 2006). Se fijó un chip que contenía la punta al soporte para calibrar. A continuación, tras focalizar el láser sobre la punta y utilizando el modo dinámico del programa *WSxM (Nanotec Electronica S.L.)* (Horcas et al., 2007) se sometió la punta a un voltaje superior a 2 V en un determinado rango de frecuencias (normalmente 18.000-21.000 Hz), generando una curva de resonancia con una frecuencia máxima en torno a 19.000 Hz. La curva de resonancia se ajustó a una distribución lorentziana mediante el programa de cálculo *OriginPro 8 (OriginLab Corporation)*. Utilizando los valores de frecuencia máxima de resonancia, amplitud de la curva y factor de calidad que se obtienen de dicho ajuste, junto con las medidas de la micropalanca (200 μm x 40 μm) y los valores de densidad (1,18 kg/m³) y viscosidad (1,86 x 10⁻⁵ kg/m x s) del aire, se calculó su k_c utilizando la fórmula proporcionada en:

<http://www.ampc.ms.unimelb.edu.au/afm/calibration.html#normal>

3.13.4. Obtención de imágenes de partículas víricas de MVM en medio líquido

Los experimentos de AFM llevados a cabo en esta memoria se realizaron utilizando el método JM (De Pablo et al., 1998) (apartado 1.5.1). Por un lado, se colocó el soporte de vidrio con la muestra ya preparada (apartado 3.13.2) sobre el piezoeléctrico. Por otro, la micropalanca calibrada (apartado 3.13.3) se colocó en la celda líquida, se fijó sobre la ventana de cuarzo limpia del soporte del mismo modo indicado para la fijación del cubreobjetos con la muestra (apartado 3.13.2) y se añadieron 20 μl de tampón PBS para prehidratar la micropalanca. De éste modo, cuando se juntaron muestra y micropalanca se formó un menisco líquido entre la punta y la superficie de la muestra. Seguidamente se focalizó el haz láser sobre el extremo de la micropalanca y centró el haz láser sobre el fotodiodo.

Una vez focalizado el láser, se acercó el soporte de vidrio con la muestra a la punta operando el AFM en modo contacto (CM). Para entrar en contacto se usaron los siguientes

valores: i) deflexión máxima de la micropalanca (*set point*): 0,2 V, ii) ganancia de señal (*Z gain*) en $Z=15$, iii) valores de retroalimentación de la señal (P e I), $P < 50$, $I = P/2$. El motor hace avanzar la muestra a lo largo del eje z , hasta que la punta contacta con el vidrio y se deflexiona hasta el *set point*.

A continuación se cambió a JM: i) *set point* unas diez veces menor que en CM; ii) valores de retroalimentación de la señal (P e I), $200 > P > 90$, $I = P/2$; iii) *Z gain* = 10; iv) separación máxima entre punta y muestra (*jump off*) no inferior a la altura de la partícula a medir (normalmente 25 nm para partículas de MVM); v) tiempo que se mantiene activado el sistema de realimentación (*control cycles*), entre 7 y 30 ms; vi) número de puntos que constituyen la *Fz* o *Jump sample*, doble que el valor de *jump off*. Una vez modificados estos parámetros, se fijó un área de barrido adecuada, así como la cantidad de puntos que constituirían la imagen, y se inició la obtención de imágenes mediante la generación de una curva *Fz* (Figura 4) en cada uno de los puntos de un área adecuada de la muestra.

La fuerza total (F_{total}) ejercida sobre la muestra es la suma de la fuerza aplicada (F_{ap}) más la fuerza de adhesión (F_{adh}):

$$F_{total} = F_{ap} + F_{adh} \quad [\text{Ecuación 2}]$$

La F_{ap} es controlada por el usuario y surge de la interacción compresiva perpendicular de la punta sobre la muestra; la F_{adh} , que depende de las condiciones experimentales, hace referencia a la fuerza necesaria para separar la punta de la muestra cuando estas han quedado adheridas entre sí. Al realizar cada curva *Fz*, los datos registrados fueron la deflexión de la micropalanca (en voltios, V) en función del desplazamiento del piezoeléctrico en la dirección z (en nm). La deflexión se convirtió a fuerza haciendo uso de la ley de Hooke:

$$F = -k x \quad [\text{Ecuación 3}]$$

F es la fuerza de interacción, k es la constante elástica, y x es la deflexión. La relación entre la distancia que la micropalanca se deflexiona y el voltaje medido por el fotodiodo (sensibilidad), se determinó haciendo una curva *Fz* sobre un el vidrio, que es indeformable. Cuando ocurre así, la deflexión en la región de contacto (zona C-D en la Figura 4) coincide con la dilatación en z del piezoeléctrico, y la pendiente de esta curva proporciona el factor de sensibilidad. Multiplicando los valores de deflexión por el factor de sensibilidad se obtiene el desplazamiento de la micropalanca, y multiplicando el desplazamiento por la

constante elástica de la micropalanca (k_c , ver apartado 3.13.3), se puede obtener la fuerza ejercida sobre la muestra.

$$F(nN) = k_c(nN/nm) \times \text{deflexión}(V) \times \text{sensibilidad}(nm/V) \quad [\text{Ecuación 4}]$$

La interpretación de los datos durante la medida con el AFM permite obtener en tiempo real la imagen topográfica de la superficie del soporte de vidrio y de las partículas virales depositadas sobre la misma (De Pablo et al., 1998), ajustando los parámetros necesarios para una mejor visualización de las partículas y su orientación.

Para el tratamiento de las imágenes de AFM y la identificación de las características topográficas de cada uno de los ejes de simetría de las partículas, se utilizó el propio programa de medida del AFM. Antes de hacer cualquier medida sobre una partícula se comprobó que mantenía la integridad estructural y se identificó la simetría sobre la que la punta incidiría. En la Figura 3 se muestran imágenes representativas de cápsidas de MVM individuales en diferentes orientaciones, visualizadas por AFM siguiendo este procedimiento.

3.13.5. Determinación de la rigidez mecánica de partículas de MVM en medio líquido

En primer lugar se realizaron imágenes con resolución suficiente para confirmar la integridad física y determinar la orientación de las partículas cuya rigidez se quería determinar. Cuando se identificó una partícula de MVM aparentemente intacta, con la altura correcta y en una orientación adecuada (Figura 3), se realizaron una serie de indentaciones sobre la parte central (más alta) de la partícula en cuestión, obteniéndose como resultado una curva fuerza-distancia (Fz) (Figura 4).

A continuación se hicieron 3 indentaciones sobre el vidrio para conocer la sensibilidad del sistema en el momento de la indentación (apartado anterior), seguidas de tandas de 5 indentaciones con fuerza elevada (≈ 1 nN) sobre la partícula, ajustando empíricamente los valores de medida, de forma que la micropalanca no indentara en la partícula más de 2 nm (espesor promedio la cápsida de MVM). En todo momento se comprobó si la partícula mantenía su integridad y orientación, y cuando no fue así se descartaron las mediciones realizadas sobre esa partícula. Tras concluir las tandas de indentaciones sobre la partícula, se realizaron otras 3 indentaciones sobre vidrio. Finalmente se comprobó una última vez mediante imagen si la partícula seguía centrada y en la misma orientación y conservaba su forma y altura originales. Cabe destacar que

durante los experimentos de medida de k_s a veces se sobrepasa la fuerza promedio de 1 nN en las indentaciones realizadas; para dar los valores de k_s sólo se tuvieron en cuenta las curvas Fz que tuvieron comportamiento lineal y cuya indentación sobre la partícula fuese menor de 2 nm. Además, si la partícula presentaba algún indicio de ruptura o cambio de orientación en la imagen posterior a las indentaciones se descartaban esos datos para determinaciones de rigidez mecánica (aunque pudieron utilizarse para estudios de desensamblaje mecánico, ver apartado siguiente).

Para averiguar la indentación de la cápsida en cada Fz realizada se utilizó la herramienta específica del programa de medida, que mide la distancia entre la punta y la muestra teniendo en cuenta los valores de k_c de la micropalanca y la sensibilidad del sistema.

Una vez seleccionadas las Fz válidas según los criterios anteriormente descritos, se analizó el tramo lineal de cada curva Fz realizada sobre la partícula; la pendiente proporcionó una medida de la constante elástica efectiva (k_{ef}) del sistema. Los valores obtenidos experimentalmente para k_{ef} y para la constante elástica de la micropalanca (k_c) permitieron determinar la constante elástica de la muestra (k_s) a lo largo de la dirección de la fuerza aplicada, aplicando la ecuación correspondiente a un sistema de dos muelles en serie:

$$1/k_{ef} = (1/k_c) + (1/k_s) \Rightarrow k_s = (k_c \times k_{ef}) / (k_c - k_{ef}) \quad [\text{Ecuación 5}]$$

Se calculó el promedio y la desviación estándar de k_s a partir del conjunto de todas las Fz independientes realizadas sobre todas las partículas de un mismo tipo y en el mismo eje de simetría (S2, S3 o S5).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la aplicación del test *t* de Student (Gosset, 1908). Los valores promedio de k_s obtenidos para dos tipos de partículas diferentes se consideraron significativamente distintos cuando el valor del estadístico (*t*) resultó inferior a 0,05, con un nivel de confianza del 95%. Tanto los cálculos como los ajustes matemáticos y el análisis estadístico efectuaron con el programa *OriginPro 8* (OriginLab Corporation).

3.13.6. Análisis del desensamblaje mecánico de partículas de MVM en medio líquido

El procedimiento fue similar al descrito en el apartado anterior, con algunas modificaciones importantes. Durante dichos experimentos partículas individuales adsorbidas sobre vidrios silanizados fueron sometidas a indentaciones de fuerza elevada ($\approx 1\text{nN}$), en los que la profundidad real de indentación varió entre 0,5-9 nm. La serie de indentaciones sobre cada partícula se terminó, generalmente, cuando la partícula sufrió una modificación estructural irreversible, detectable gracias a la comparación entre imágenes que se obtuvieron antes y después de cada serie de indentaciones. En ocasiones, después de que la partícula se había modificado estructuralmente, se llevaron a cabo indentaciones adicionales para inducir nuevas modificaciones estructurales irreversibles, y se tomaron nuevas imágenes. La curva F_z obtenida para cada evento de indentación se procesó para obtener la fuerza aplicada sobre la partícula (apartado 3.13.5.) mientras que la profundidad de indentación se calculó como se describe en el apartado anterior.

Aquellas curvas F_z que pudieron ser claramente identificadas como responsables de un cambio estructural irreversible de una partícula vírica fueron analizadas para conocer la energía disipada durante el proceso. La energía disipada se estimó siguiendo un método descrito anteriormente para otros ensamblados biológicos sometidos a cambios estructurales irreversibles (Schaap et al., 2006; Ivanovska et al., 2011). Se utilizaron curvas F_z obtenidas en eventos de indentación que pudieron ser inequívocamente asociados a una modificación estructural irreversible de partículas de MVM, reflejada en la pérdida del régimen lineal durante la indentación (Figura 10). El trabajo se estimó a partir del área definida por la diferencia en la pendiente de la curva antes y después del punto en el que una caída repentina en la fuerza pudo observarse (Figura 10.b). En el caso de curvas con múltiples etapas de bruscas pérdidas de linealidad en la relación Fuerza-distancia (Figura 10.c), la energía total se estimó mediante la suma de las energías calculadas para cada etapa.

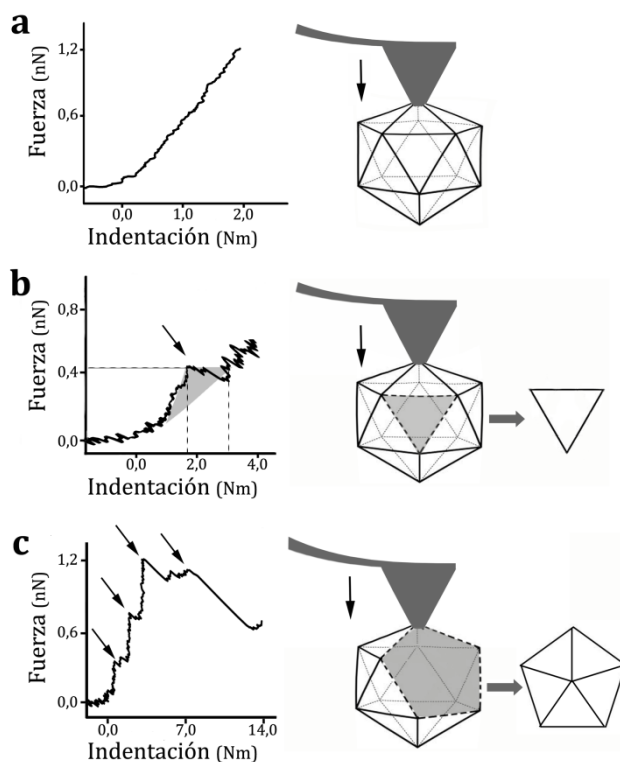


Figura 10. Desensamblaje mecánico de partículas de MVM. Se muestran curvas Fz representativas obtenidas mediante indentación con la punta de AFM como se detalla en el texto: **a)** indentación con comportamiento elástico donde la partícula no pierde integridad estructural; **b)** indentación que produce la pérdida de un trímero de VPs; **c)** indentación en la que se pierde un pentámero de trímeros. En las curvas Fz las flechas señalan los saltos de fuerza asociados con la pérdida de subunidades, mientras que la zona sombreada delimita el área usada para el cálculo de la energía disipada durante la eliminación de un trímero. Los esquemas de la derecha muestran los intermediarios formados en cada caso.

3.14. Visualización de estructuras moleculares, modelado molecular y cálculos estructurales

Se utilizaron los programas *WHATIF* (Vriend, 1990), *RasMol* (Sayle y Milner-White, 1995), *CAST* (Dundas et al., 2006), *Pymol* (DeLano, 2002) y *VMD* (Humphrey et al., 1996), según el caso, y las coordenadas cristalográficas obtenidas para el virión de MVMi (códigos PDB: 1MVM y 1Z1C) (Llamas-Saiz et al., 1997; Kontou et al., 2005) y la cápsida vacía de MVMp (código PDB: 1Z14) (Kontou et al., 2005). En particular, los cálculos de accesibilidad al solvente y del número y naturaleza de los contactos intra o intersubunidades se realizó mediante *WHATIF*, el análisis de cavidades se realizó mediante *CAST*, *WHATIF* o *Pymol*, la mutagénesis virtual se realizó mediante *Pymol*, la inspección visual de las estructuras, interacciones, mutaciones virtuales, filtrado, etc, se realizó mediante *Pymol*, *Chimera*, *VMD* o *RasMol*. Las representaciones gráficas se realizaron con *Pymol*, *Chimera* o *RasMol*.

El análisis de la carga eléctrica de la cara interna de la cápsida de MVM se llevó a cabo utilizando los programas de modelado molecular *Pymol* y *VMD*. Se tuvo en cuenta todo residuo (ácido o básico) que tuviera su grupo cargado visible en la estructura cristalográfica y expuesto al solvente hacia el interior de la cápsida, así como todos los residuos de los segmentos Nt de las proteínas de la cápsida, que no son visibles por

cristalografía, pero que se encuentran expuestos al solvente en el interior de la partícula vírica (Figura 11).

3.15. Cálculo, representación y análisis estadístico de datos

Para las representaciones gráficas y análisis de datos numéricos se utilizó el programa *KaleidaGraph* (*Abelbeck Software*). Para el cálculo de constantes elásticas, promedios y desviaciones estándar en experimentos de AFM se usó *Excel* (*Microsoft Corporation*), y *OriginPro 8* (*OriginLab Corporation*) para los ajustes lineales de pendientes, ajustes Gaussianos y Lorencianos, cálculos de indentación, análisis estadísticos y representaciones gráficas en experimentos de AFM.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Papel funcional de residuos cargados en la cara interna de la cápsida

El primer objetivo de esta Tesis se dirigió a investigar los posibles papeles estructurales y funcionales de la presencia y distribución de residuos eléctricamente cargados en la pared interna de una cápsida vírica, un aspecto muy poco conocido de las relaciones estructura-función en virus. En el caso de MVM y otros virus estos estudios resultan particularmente interesantes, porque la cara interna de la cápsida no presenta una carga neta positiva que neutralice la fuerte densidad de carga negativa del ácido nucleico empaquetado en el virión (apartado 1.4).

4.1.1. Análisis del número y distribución de grupos cargados en la cara interna de la cápsida de MVM.

Se determinó en primer lugar el número de cargas positivas (grupos amino de Lys y guanidinio de Arg, y también el grupo imidazol de His, asumiendo que éste se encuentra en general cargado a pHs fisiológicos, debido al aumento de pKa por la presencia de grupos vecinos cargados negativamente) y de cargas negativas (grupos carboxilato de Asp y Glu) en la pared interna de la cápsida de MVMp, el virus modelo utilizado en nuestro estudio. Para ello, se utilizó la estructura cristalográfica de la cápsida de MVMp (1Z14; (Kontou et al., 2005) y el programa *WHATIF* (Vriend, 1990). Se obtuvo una lista de todos los residuos cargados cuyo grupo ácido o básico se encuentra parcial o completamente expuesto al solvente. A continuación se utilizó el programa *Pymol* (DeLano, 2002) para determinar cuáles de estos residuos con un grupo cargado expuesto al solvente se encuentran en la cara interna de la cápsida (y no en la externa). Los residuos localizados en los segmentos Nt de VP2 o VP1 son invisibles por cristalografía, pero se encuentran desorganizados en el interior de la cápsida, por lo que se aceptó que todos los residuos cargados en estos segmentos se encuentran parcial o totalmente expuestos al solvente en la cara interna de la cápsida. El cálculo del número total de cargas se hizo para una cápsida nativa extracelular que contiene 51 copias de VP2 y 9 copias de VP1.

El resultado de este análisis (Tabla 2) mostró que en la cara interna de la cápsida de MVMp se localizan un total de 1254 grupos cargados positivamente y 1197 grupos cargados negativamente. Es decir, existe un exceso de solo 57 grupos con carga positiva en

toda la cara interna de la cápsida, lo que corresponde a solo un grupo cargado positivamente por subunidad. Por comparación, el genoma de MVM contiene aproximadamente 5500 fosfatos cargados negativamente, de modo que únicamente un 1% de los mismos, aproximadamente, serían neutralizados por el ligero exceso de carga positiva que presenta la cara interna de la cápsida.

Tabla 2. Residuos cargados en la cara interna de MVM			
	Nº Residuos	Total	
Visible por cristalografía ^a			
Asp	9	14	
Glu	5		
Lis	7	14	
His	4		
Arg	3		
Extremos Nt ^b			
VP2	Asp	3	4
	Glu	1	
	Lis	0	3
	His	1	
	Arg	2	
VP1	Asp	9	13
	Glu	4	
	Lis	15	26
	His	2	
	Arg	9	

Se cuantificaron todos aquellos que mostraban el grupo cargado expuesto hacia el interior de la cápsida. Se dan los números para una única copia de VP2 o VP1. En rojo están los residuos ácidos y en azul los básicos. **a)** Aquellos residuos que están ordenados y son visibles en la estructura cristalográfica. **b)** Aquellos residuos que están en los Nt, no ordenados y por tanto no visibles mediante cristalografía.

En el caso de VLPs formadas únicamente por VP2, los números son muy similares: 1020 grupos cargados positivamente y 1080 grupos cargados negativamente, con un exceso de 60 grupos negativos por cápsida, o un grupo negativo por subunidad. En ambos casos, cápsida vacía con VP1 y VP2, y VLP con solo VP2, la densidad de carga media en la cara interna de la cápsida (el balance de grupos cargados) es cercana a 0. El procesamiento de los primeros 25 residuos del Nt de VP2 durante la internalización del virión tampoco altera significativamente este resultado.

Se analizó a continuación la distribución de los grupos cargados en la pared interna de la cápsida (sin tener en cuenta los grupos en los Nt desorganizados). La distribución de cargas resultó en general homogénea, con grupos cargados positivamente cerca de grupos cargados negativamente y viceversa, estableciendo interacciones iónicas atractivas entre ellos, y neutralizando en buena medida sus correspondientes cargas. Sin embargo, se observaron algunas regiones con una distribución claramente no neutra (Figura 11). En particular, se encontraron cúmulos conspicuos de residuos cargados negativamente (E146, D263 y E264A) en 60 posiciones equivalentes cerca de los poros de la cápsida situados en los ejes S5. Por tanto, la pared interna de la cápsida presenta un anillo con un fuerte exceso de carga negativa alrededor de cada poro de la misma (Figura 11).

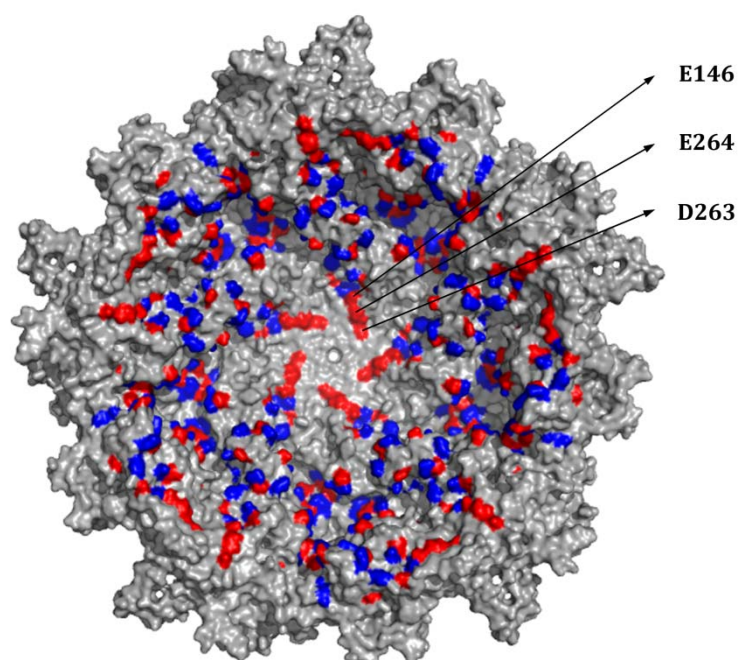


Figura 11. Distribución de los residuos cargados en el interior de la cápsida de MVM. Para mayor claridad se representa sólo un pentámero de trímeros de MVM (una cuarta parte de la cápsida) visto desde la cara interna con el poro del eje S5 en el centro. Los residuos ácidos se indican en rojo y los básicos en azul. Se identifican los residuos (E146, D263 y E264A) que forman un anillo de 15 residuos cargado negativamente y situado cerca y alrededor del poro.

Se han realizado los análisis anteriores también sobre la estructura cristalográfica del virión de MVMi (1Z1C; (Llamas-Saiz et al., 1997) (resultados no mostrados). Como se esperaba de la gran similitud de secuencia de las VPs y estructuras de cápsida y virión de las cepas p e i de MVM, las conclusiones anteriores sobre número y distribución de cargas resultan válidas tanto para la cápsida vacía como para el virión de las dos cepas.

4.1.2. Diseño racional de mutaciones para el análisis estructura-función de grupos cargados y su distribución en la pared interna de la cápsida

Utilizando MVM como virus esférico modelo, nos planteamos analizar si la presencia de grupos ácidos o básicos en la pared interna de la cápsida, así como la distribución de cargas en la misma debida a la presencia y posiciones de estos grupos, ejerce algún papel funcional. Más en concreto, nos hicimos las siguientes preguntas:

1- ¿Qué efectos funcionales produce la eliminación de residuos básicos en la pared interna de la cápsida? Al eliminar un grupo básico por subunidad, el número de cargas positivas se reduciría en 60 unidades.

2- ¿Qué efectos funcionales produce la eliminación de residuos ácidos de la pared interna de la cápsida? Al eliminar un grupo ácido por subunidad, el número de cargas negativas se reduciría en 60 unidades.

3- ¿Qué efectos funcionales produce la sustitución en la pared interna de la cápsida de grupos polares neutros por grupos básicos, que puedan establecer nuevas atracciones iónicas con los fosfatos de los segmentos de ADN unidos a la pared de la cápsida? Al introducir un grupo básico por subunidad el número de cargas positivas aumentaría en 60 unidades. Además, sería de esperar que estas mutaciones estabilizaran más la interacción, observada en MVM y otros parvovirus, entre segmentos de ADN y la cápsida.

4- ¿Tienen los anillos de carga negativa alrededor de los poros algún efecto funcional y, en caso afirmativo, se debe este efecto a la presencia de los grupos cargados (carboxilatos de E146, D263, E264)? Puesto que se ha demostrado una importancia funcional de los poros de la cápsida y de la región que rodean la base de cada poro, podríamos tal vez esperar que estos anillos de carboxilatos tuvieran algún efecto biológicamente relevante.

5- ¿Son los posibles efectos producidos por las mutaciones planteadas para responder las preguntas anteriores dependientes de la posición del residuo cargado concreto y de su posición, o pueden observarse efectos generales?

Para cada una de las preguntas anteriores, la elección de residuos cargados a mutagenizar para un análisis estructura-función extenso se realizó siguiendo

principalmente dos criterios, de modo dependiente de la pregunta concreta que se deseaba responder.

i) Grado de conservación en parvovirus. Se utilizó un alineamiento de secuencias de la proteína de la cápsida de 7 parvovirus diferentes (Chapman y Rossmann, 1993). Se encontró que la mayoría de los residuos cargados en la pared interna de la cápsida se encuentran muy conservados, al menos en los parvovirus evolutivamente más próximos a MVM. Para responder a las preguntas 1 y 2, elegimos en general residuos muy conservados, para los que se esperaba una implicación funcional. En cambio, para responder a la pregunta 3 elegimos en general residuos muy poco conservados, de modo que el posible efecto de establecer nuevas interacciones cápsida-ADN no se viera comprometido por la pérdida de alguna función en la que el residuo original estuviera implicado.

ii) Número y tipo de interacciones de la cadena lateral con otros residuos de la cápsida, tratando de que fuera mínimo. De este modo, el efecto del truncamiento de la cadena lateral (por mutación a alanina) podría atribuirse más fácilmente al efecto de la eliminación (preguntas 1 y 2) o introducción (pregunta 3) del grupo cargado. Se consideraron óptimos aquellos residuos que no establecían interacciones de elevada energía con otros residuos (como, por ejemplo, muchos contactos de van der Waals carbono-carbono, que contribuirían un fuerte efecto hidrófobo), o puentes de hidrógeno o puentes salinos enterrados (no expuestos al solvente).

La Tabla 3 muestra los mutantes seleccionados para estos análisis, clasificados por grupos según la pregunta que pretendían responder (1 a 4): Grupo 1, eliminación de grupos básicos; grupo 2, eliminación de grupos ácidos; grupo 3, sustitución de grupos polares neutros cercanos a los segmentos de ADN unidos a la cápsida por grupos básicos; grupo 4, sustitución (individual o conjunta) de grupos ácidos del anillo cargado negativamente alrededor de cada poro de la cápsida por grupos isostéricos neutros (para eliminar específicamente la carga), o sustituciones de Asp a Glu o viceversa (para mantener la carga pero modificar la cadena lateral). La lógica de las sustituciones elegidas se irá comentando con más detalle en los siguientes apartados.

Tabla 3. Mutantes que varían la carga de la cara interna de MVM

	Cadena lateral ^a	Conservación ^b	Contactos Totales ^c
Grupo 1	R54A	5*	1PS (E62)
	K471A	7	2(2) vW
	K478A	7	5(1) vW ;2PH (L475)
	R480A	6	28(9)vW; 2PH (H477),1PH (K478), 1PH (K478),1PH (Y450)
	K490A	4	4(1) vW; N275 (1PH)
Grupo 2	D115A	7	8(3) vW;1PH (N117), 2PH (A191)
	E146A	7	4(3)vW
	D263A	7	10(3) vW; 1PH (S43), 1PS(R260)
	E264A	6	1(1) vW
	E472A	6	5(3) vW; 2PS (H482)
	D474A	7	6vW; 1PH (K278)
Grupo 3	Q137K	1	2 vW
	S182H	5	-
	Q255R	1	3 vW
	T257K	2	-
	N275K	1	1PH (L490)
Grupo 4	E146D	7	
	D263E	7	
	E264D	6	
	E146D/D263E/E264D		
	E146Q	7	
	D263N	7	
	E264Q	6	
	E146Q/D263N/E264Q		

La tabla muestra todas las mutaciones que se utilizaron para el estudio de la influencia en las propiedades biológicas de MVM de la distribución electrostática de la cara interna de la cápsida.

^a Mutación realizada en las proteínas estructurales VP1/VP2 de MVM. ^b Número de parvovirus relacionados, de 7 analizados (Chapman y Rossmann, 1993), en los que el residuo original está conservado. * en este caso particular el número indica conservación de la carga, no del residuo concreto. ^c Número y tipo de contactos que tiene el residuo original (más allá de su carbono β) con otros aminoácidos cercanos. Se indica el número de contactos de van der Waals total con cualquier residuo cercano y, entre paréntesis, el número de dichos contactos que son C-C. *vW* contactos de Van der Waals, *PH* puente de hidrógeno, *PS* Puente salino. Los grupos son los siguientes: 1) mutaciones que eliminan grupos básicos, 2) mutaciones que eliminan grupos ácidos, 3) mutaciones que introducen grupos básicos en posiciones polares neutras, 4) mutaciones que sustituyen grupos ácidos situados en un anillo de cargas negativas alrededor de cada poro de la cápsida por grupos isostéricos neutros para eliminar específicamente la carga, o que modifican la cadena lateral de aquellos sin eliminar la carga.

4.1.3. Análisis de efectos funcionales de mutaciones que cambian el número y distribución de grupos cargados en la pared interna de la cápsida

Efecto sobre el ensamblaje de la cápsida. Introdujimos las mutaciones de los grupos 1, 2 y 3 descritos el apartado anterior (Tabla 3) en el plásmido pSVtk-VP1/VP2 (apartado 3.3). A continuación se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia *in situ* (apartado 3.7) sobre células transfectadas con esos plásmidos (parental y 16 mutantes), para cuantificar el efecto de dichas mutaciones sobre el ensamblaje de la cápsida (Figura 12). Utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las proteínas de la cápsida (apartado 3.6) se comprobó que todos los mutantes producían cantidades comparables de proteína de la cápsida (resultados no mostrados). Utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente cápsidas ensambladas (apartado 3.7), y normalizando los resultados, se observó que todos los mutantes excepto D115A ensamblan cantidades similares de cápsidas (Figura 12). Por tanto, la presencia individual de cargas en la pared interna de la cápsida, independientemente de su signo o su posición, incluso cerca de las interfases entre subunidades, y aun estando algunas muy conservadas entre parvovirus relacionados con MVM, no es necesaria para el correcto ensamblaje de la cápsida. Un aumento de 60 cargas positivas o negativas en la pared interna no produce un efecto significativo en el ensamblaje de la cápsida.

Efecto sobre la infectividad del virión. Introdujimos las mismas mutaciones de los grupos 1, 2 y 3 (Tabla 3) en el plásmido infeccioso pTRp (apartado 3.3.2). A continuación se transformaron células NB324K con esos plásmidos (parental y 15 mutantes; la cápsida mutante D115A no ensambla, por lo que esta mutación no se analizó en ensayos de infectividad) (apartado 3.1.5). Se comprobó mediante inmunoensayos de *Western blot* con un anticuerpo policlonal que reconoce VPs (apartado 3.10.3) que en todos los casos se produjeron proteínas virales. A continuación, se determinaron los títulos de viriones producidos (apartado 3.1.5) a partir de cada plásmido infeccioso (parental y mutantes) (Tabla 4). Todos los experimentos se hicieron al menos por duplicado, normalizando los datos obtenidos respecto a un control no mutado presente en el mismo experimento.

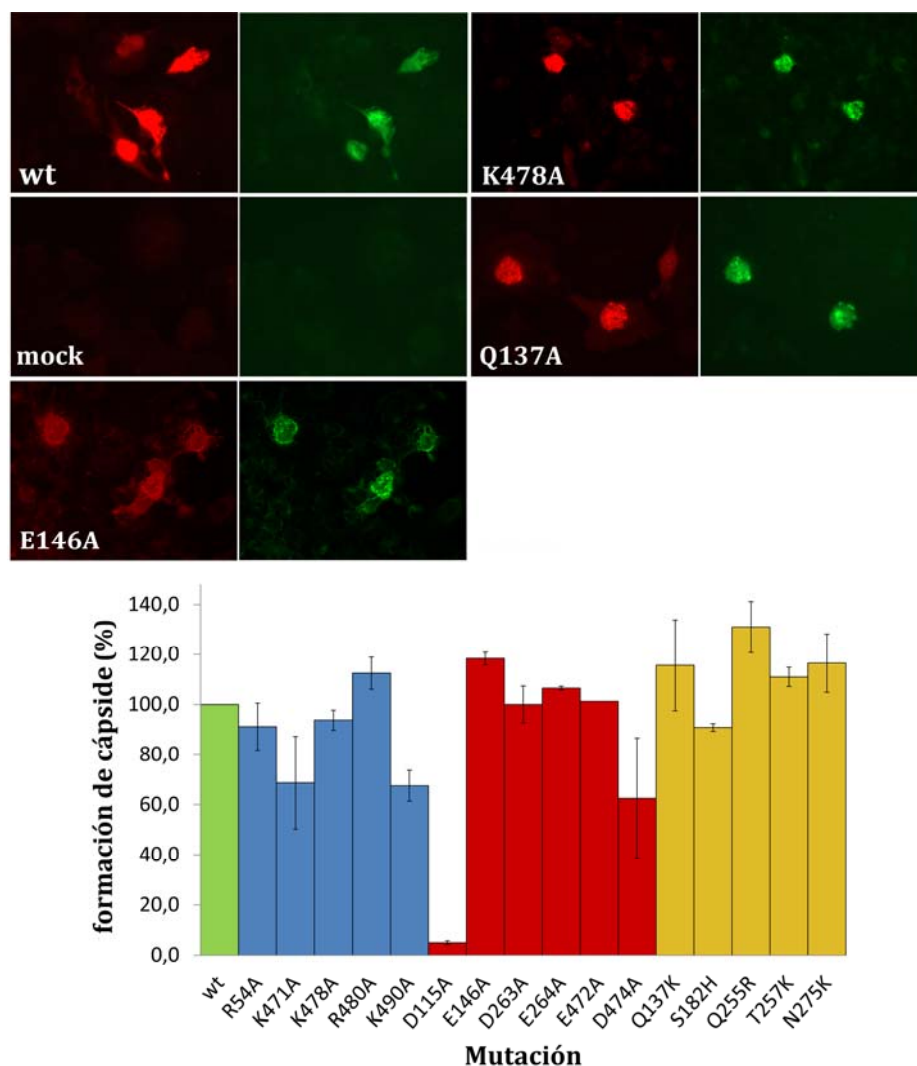


Figura 12. Inmunofluorescencia *in situ* de la formación de cápsidas mutantes de MVM con alteraciones de carga de la pared interna. En la parte superior se muestran imágenes representativas de expresión de VPs (*rojo*) y ensamblaje de cápsidas vacías (*verde*) en células NB324K transformadas con el plásmido recombinante pSVtk-VP1/VP2. Las fotografías corresponden a: control no mutado (*wt*); control negativo (*mock*); mutantes representativos de cada uno de los grupos, 1, 2 o 3: E146A-grupo 1, K478A-grupo 2 y Q137K-grupo 3. En la parte inferior se muestra la estimación de la cantidad relativa (en porcentaje) de cápsida ensamblada para cada mutante analizado, comparada con la cantidad de cápsida no mutada (barra verde). Los resultados para los mutantes de los grupos 1, 2 o 3 se indican respectivamente en azul, rojo o amarillo.

Tabla 4. Infectividad normalizada de viriones mutantes de MVM con alteraciones de cargas en la pared interna.

	Mutación	Infectividad
	wt	1
Grupo 1	R54A	0,07 ± 0,1
	K471A	0,1 ± 0,1
	K478A	0,01 ± 5,3 x 10 ⁻³
	R480A	0,64 ± 0,4
	K490A	0,36 ± 0,8
Grupo 2	D115A	No ensambla
	E146A	<9 x 10 ⁻⁹
	D263A	<9 x 10 ⁻⁹
	E264A	<1 x 10 ⁻⁴
	E472A	0,19 ± 0,08
	D474A	<1 x 10 ⁻⁴
Grupo 3	Q137K	1,45 ± 0,68
	S182H	<4 x 10 ⁻⁶
	Q255R	0,88 ± 0,34
	T257K	0,69 ± 0,56
	N275K	1,13 ± 0,69
Grupo 4	E146D	0,77 ± 0,17
	D263E	7,7 x 10 ⁻⁴ ± 7,6 x 10 ⁻⁴
	E264D	3,5 x 10 ⁻⁴ ± 1,4 x 10 ⁻⁴
	E146D/D263E/E264D	1,0 x 10 ⁻³ ± 8,5 x 10 ⁻⁵
	E146Q	0,35 ± 0,27
	D263N	1,3 x 10 ⁻³ ± 1,7 x 10 ⁻³
	E264Q	3,7 x 10 ⁻⁵ ± 1,6 x 10 ⁻⁵
	E146Q/D263N/E264Q	<2 x 10 ⁻⁶

La eliminación individual de grupos básicos (grupo 1) produjo en general reducciones de infectividad no significativas o moderadas (un orden de magnitud). Únicamente en un caso (mutante K478A) la reducción de infectividad fue algo más acusada (dos órdenes de magnitud), y cursó además con reducción del tamaño de la placa de lisis. La eliminación individual de grupos ácidos (grupo 2), en cambio, produjo reducciones drásticas de infectividad (entre más de 4 y más de 8 órdenes de magnitud) en todos los casos, excepto uno (E472A), en que la infectividad se redujo solo moderadamente. Las mutaciones individuales de los tres residuos que participan en cada

anillo de grupos ácidos alrededor de cada poro de la cápsida fueron las que produjeron mayores reducciones de infectividad entre todas las mutaciones analizadas en este trabajo.

Finalmente, la sustitución individual de grupos polares neutros cercanos a los segmentos de ADN unidos a la cápsida (grupo 3) por grupos básicos que pudieran establecer nuevas interacciones iónicas con estos segmentos de ADN no tuvo ningún efecto significativo sobre la infectividad, excepto en un caso (S182H), en que la infectividad se redujo drásticamente. Es interesante destacar que tanto las mutaciones del grupo 2 como las del grupo 3 aumentan cada una de ellas la carga positiva de la cara interna de la cápsida en +60 unidades. Sin embargo, los efectos sobre la infectividad son completamente diferentes según se eliminan grupos ácidos (grupo 2) o se introducen grupos básicos (grupo 3). Esto indica que los efectos deletéreos de las mutaciones del grupo 2 no son simplemente debidas al aumento de carga positiva de la pared interna de la cápsida, sino que obedecen a otro efecto estructural (apartado 1.6.1).

Efecto sobre la resistencia del virión a la inactivación térmica de su infectividad. En un estudio previo del laboratorio demostramos que la eliminación de interacciones de residuos de la pared interna de la cápsida con los segmentos de ADN vírico unidos a ella reduce la resistencia del mismo a la inactivación térmica (Reguera *et al.*, 2005). Por ello, decidimos analizar aquí si algunas de las mutaciones de cambio de carga en la pared interna de la cápsida (entre aquellas que no produjeron efectos drásticos sobre la infectividad del virión) tenían algún efecto (negativo o positivo) sobre la resistencia del mismo a la inactivación por calor. Los ensayos se realizaron incubando una cantidad conocida de viriones a temperatura elevada (70°C), y determinando el título de viriones infectivos en función del tiempo en experimentos repetidos y normalizados, como se describe en el apartado 3.9. Los datos se ajustaron a procesos de decaimiento exponencial, y se obtuvieron constantes de velocidad de inactivación, que se normalizaron frente a la obtenida para el control no mutado en el mismo experimento (Figura 13). La mayoría de las mutaciones ensayadas no tuvieron efectos significativos sobre la resistencia del virión a la inactivación térmica. Sin embargo, las mutaciones Q137K, Q255R, y R54A produjeron reducciones significativas y notables en la resistencia del virión a su inactivación por calor. Es interesante destacar que estos tres residuos se localizan en posiciones próximas a los segmentos de ADN unidos a la cápsida.

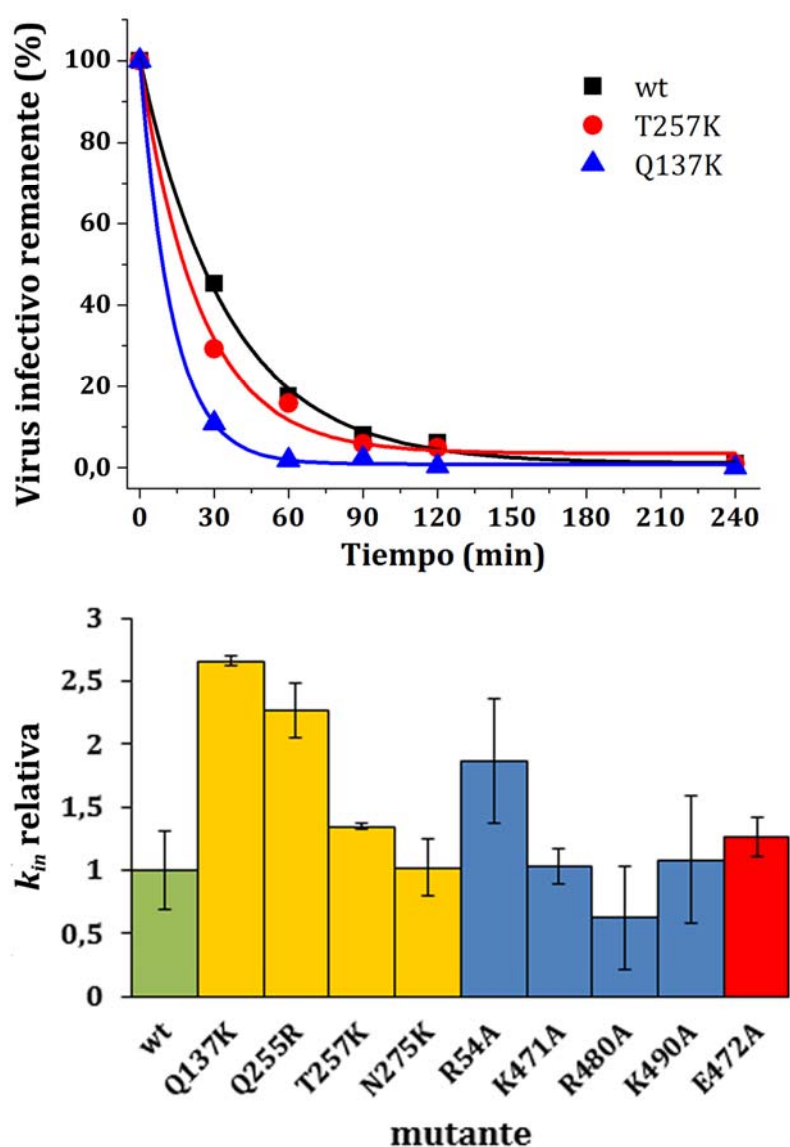


Figura 13. Inactivación térmica de viriones mutantes de MVM con alteraciones de cargas en la pared interna. El gráfico superior muestra curvas de inactivación representativas, obtenidas a 70°C para 2 mutantes (T257A, rojo; Q137K azul) y el control no mutado (wt, negro). Los datos experimentales (símbolos) se ajustaron a procesos de decaimiento exponencial (líneas continuas). El gráfico inferior muestra las constantes de velocidad de inactivación relativas (k_{in} relativa), normalizadas frente a la constante obtenida para el control no mutado (barra verde). Los datos se obtuvieron al menos por duplicado; se indica en cada caso la media y la desviación estándar. Los resultados para los mutantes de los grupos 1, 2 o 3 se resaltan respectivamente en azul, rojo o amarillo.

4.1.4. Bases estructurales de la importancia funcional de anillos de residuos ácidos internos localizados alrededor de los poros en la cápsida

Trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Reguera *et al.*, 2004; Castellanos *et al.*, 2012a) demostraron que un anillo de residuos en la pared interna de la cápsida, que delimita estrechamente la base de cada poro de la misma, es crítico para la infectividad del virión. Estos residuos están implicados en mantener la flexibilidad local, y de este modo permiten una transición conformacional de la cápsida asociada a la externalización de Nts a través de los poros (apartado 1.6.2). El anillo de 15 residuos ácidos (E146, D263 y E264), igualmente crítico para la infectividad, se encuentra rodeando el poro y los residuos anteriores. Por lo tanto, consideramos la posibilidad de que las cargas y/o las cadenas laterales de estos residuos sean asimismo importantes para dicha transición conformacional. En tal caso, su eliminación debería eliminar esa transición, que puede detectarse mediante la variación de inmunofluorescencia intrínseca de triptófanos de la cápsida en función de la temperatura (apartado 3.8). Se realizaron dichos ensayos por triplicado con dos de las cápsidas mutantes (E146A y E264A) y la cápsida parental como control (Figura 14).

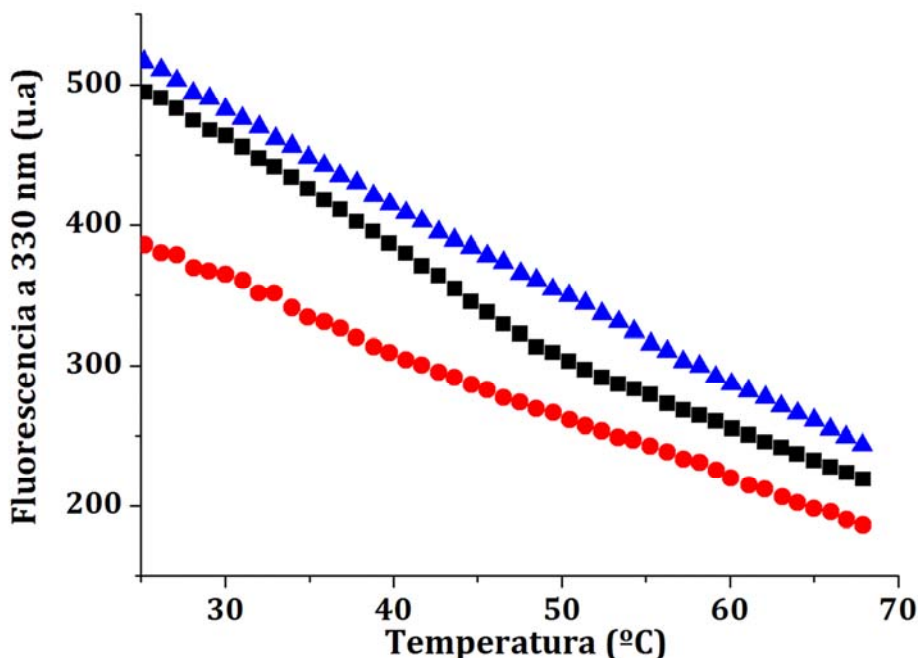


Figura 14. Análisis mediante fluorescencia de triptófanos del efecto de las mutaciones E146A y E264A sobre la transición conformacional asociada a los poros de la cápsida en VLPs de MVM sometidas a calentamiento. Se indica el resultado de un experimento representativo. Negro, control no mutado; rojo, mutante E146A; azul, mutante E264A. u.a.: unidades arbitrarias

La transición conformacional inducida por calor en la cápsida parental se detecta en estos experimentos como una pequeña, pero completamente reproducible, variación sigmoideal de la curva de fluorescencia, con cambio en la pendiente de las líneas de base inicial y final, y $T_m = (47 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (Carreira *et al.*, 2004). Ninguna de las dos cápsidas mutantes mantuvo dicho cambio conformacional. El mismo resultado se obtuvo con el mutante D263A (M. Castellanos, resultados no publicados). Por tanto, concluimos que los 3 residuos cargados que forman el anillo son críticos para mantener la dinámica conformacional de la cápsida alrededor de los poros, que permite la externalización de segmentos Nt de la proteína de la cápsida, necesaria para el proceso de infección.

A continuación nos planteamos si este papel crítico en esta transición conformacional biológicamente relevante del anillo de residuos E146, D263 y E264 alrededor de cada poro se debe específicamente al potencial electrostático negativo establecido alrededor de cada poro por los carboxilatos de estos grupos, o/y a otras interacciones no iónicas que las cadenas laterales de estos residuos establecen con grupos vecinos en la cápsida. Esta pregunta se respondió con la colaboración de Marta Hervás García, que realizó su trabajo de fin de Máster en nuestro grupo.

Construimos una serie de cápsidas mutantes (E146D, D263E, E264D) en la que se mantuvo la carga negativa, pero se modificó estéricamente la cadena lateral (y, por tanto, la posición del carboxilato), alterando de este modo las interacciones de la cadena lateral con los residuos vecinos. El análisis mostró que la mutación E146D no tuvo un efecto significativo sobre la infectividad, mientras que las mutaciones D263E y E264D redujeron la infectividad entre tres y cuatro órdenes de magnitud. Construimos y ensayamos además el triple mutante (E146D/D263E/E264D), cuya infectividad se redujo únicamente tres órdenes de magnitud, mostrando que los efectos de estas mutaciones sobre la infectividad no son aditivos.

Construimos además otra serie de cápsidas con mutaciones isostéricas (E146Q, D263N, E264Q). En éstas se eliminó la carga negativa, pero manteniendo prácticamente la geometría de la cadena lateral y todas las interacciones con residuos vecinos no debidas a la carga. De nuevo, la mutación E146Q no tuvo un efecto significativo sobre la infectividad, mientras que las mutaciones D263N y E264Q redujeron la infectividad entre tres y algo más de cuatro órdenes de magnitud. El correspondiente triple mutante (E146Q/D263N/E264Q) redujo la infectividad más de seis órdenes de magnitud, hasta hacer indetectables en nuestros experimentos viriones viables, indicando que la combinación de estas mutaciones isostéricas produce un efecto que se aproxima más a la

aditividad que las mutaciones que mantuvieron la carga pero alteraron la geometría de la cadena lateral.

La comparación del efecto sobre la infectividad de MVM de todas las mutaciones analizadas de los residuos E146, D263 y E264 permite concluir que no existe un único tipo de contribución de sus cadenas laterales a la pérdida de infectividad: i) En el caso de E146, el cambio de cadena lateral manteniendo un carboxilato cargado negativamente, o la eliminación específica de la carga mediante cambio isostérico de carboxilato a amida, no produjo apenas efecto; en cambio, la eliminación del carboxilato por mutación a alanina redujo drásticamente la infectividad. Por tanto, en esta posición se requiere la presencia de un grupo de cierto volumen (como un carboxilato o una amida), pero la existencia de una carga negativa es prescindible para la infectividad. La observación de la estructura de MVM revela que E146 se encuentra en la parte más exterior del anillo, cerca del residuo K258, cuyo grupo amino, cargado positivamente, podría estar neutralizando la carga del carboxilato de E146.

ii) en el caso de D263 y E264, tanto el cambio de cadena lateral manteniendo el carboxilato como la eliminación específica de la carga mediante cambio isostérico carboxilato-amida produjeron reducciones drásticas de infectividad. Estas fueron de magnitud comparable entre sí, pero mucho menor que el efecto del truncamiento de la cadena lateral por mutación a alanina. Por tanto, para la infectividad de MVM los carboxilatos de estos residuos en los anillos alrededor de cada poro no pueden ser sustituidos, ni su posición alterada mediante la introducción de un metileno adicional, sin que exista una drástica pérdida de infectividad. Pero la pérdida de infectividad es aún mayor si se elimina la cadena lateral (más allá del carbono β) mediante mutación a alanina lo que indica que, además de la presencia de la carga negativa, otras características del grupo carboxilato (o amida en el mutante) contribuyen, de modo cooperativo con la presencia de carga, a la infectividad del virión.

Cuando se toman en consideración los efectos combinados de las mutaciones de E146, D263 y E264, se observa que la eliminación conjunta de las $3 \times 5 = 15$ cargas negativas en cada anillo alrededor del poro, manteniendo la geometría y carácter polar de la cadena lateral y, probablemente, la mayoría de interacciones de esta con residuos vecinos, la infectividad se reduce más de 6 órdenes de magnitud. En cambio, si se cambian las cadenas laterales y la posición de los carboxilatos añadiendo o eliminando metilenos (y, en consecuencia se modifican las interacciones con residuos vecinos), pero se mantienen las 15 cargas negativas de cada anillo (y, por tanto, el potencial electrostático), la

infectividad también se reduce, pero solo en tres órdenes de magnitud. Todo ello indica que el mantenimiento de la dinámica conformacional de la cápsida alrededor de los poros y la capacidad infectiva del virión de MVM no solo requiere la presencia de ciertas cadenas laterales en los anillos discontinuos que forman los residuos 146, 263 y 264 alrededor de los poros, sino que además es necesario mantener un exceso de carga negativa en estos anillos.

Los resultados presentados en este apartado 4.1, tomados conjuntamente, permiten concluir lo siguiente: i) cuando se altera sustancialmente el potencial electrostático y su distribución en la pared interna de la cápsida de MVM, bien eliminando 60 cargas positivas o introduciendo 60 cargas positivas en diferentes posiciones, ni el ensamblaje de la cápsida ni la infectividad del virión son, en la gran mayoría de los casos, alterados significativamente. ii) la conclusión anterior es válida (con alguna excepción puntual) independientemente del residuo concreto de que se trate, de su posición en la pared interna de la cápsida (incluso si se encuentra cerca de interfases entre subunidades de la cápsida), y del tipo y número de interacciones que pueda establecer con otros residuos de la cápsida. iii) algunos residuos polares neutros (Q137, Q255) o básicos (R54) en la pared interna de la cápsida, localizados cerca de los segmentos de ADN unidos a la misma, juegan un papel en el mantenimiento de la estabilidad térmica del virión. iv) algunos residuos ácidos de la pared interna de la cápsida, que forman anillos alrededor de los poros de la misma, son críticos para la infectividad del virión. v) es necesario un mantener tanto la estructura general alrededor de los poros, como un exceso de carga negativa en dicha zona (anillos discontinuos formados por E146, D263 y D264), para mantener una apropiada dinámica conformacional de la región del poro y, por tanto, la infectividad de los viriones.

4.2. Desensamblaje mecánico de MVM e intermediarios de desensamblaje

Los tres objetivos restantes de esta Tesis se centran en la utilización de aproximaciones de "molécula única" mediante AFM para el estudio del ensamblaje/desensamblaje y relación entre estructura, propiedades mecánicas y dinámica conformacional de partículas víricas. El segundo objetivo de nuestro trabajo consistió en la investigación experimental del proceso de desensamblaje de MVM como modelo de virus icosaédrico sencillo, utilizando fuerza mecánica para inducir el desensamblaje de partículas individuales. Mediante AFM se han analizado los posibles intermediarios así producidos, que se han comparado con los predichos en estudios teóricos del

des(ensamblaje) de virus sencillos. Este estudio resulta de particular interés porque hasta el momento no se habían podido identificar y caracterizar experimentalmente estos intermediarios predichos teóricamente (apartado 1.1.2). Este estudio se ha realizado en estrecha colaboración con las Dras. M. Castellanos y R. Pérez de nuestro grupo, y con la ayuda del grupo del Dr. P.J. de Pablo. Tanto la Dras. Castellanos y Pérez como el autor de esta memoria realizaron experimentos de indentación sobre muchas partículas víricas y analizaron los resultados. En esta memoria se describen conjuntamente los resultados obtenidos por los tres investigadores, lo que permite una mejor representación estadística de los eventos de desensamblaje e intermediarios identificados.

4.2.1. Desensamblaje mecánico de la cápsida

En experimentos de AFM se sometieron muchas cápsidas individuales en medio líquido en condiciones cercanas a las fisiológicas, a indentaciones de fuerza elevada (aproximadamente 1 nN, similar a la utilizada para la ruptura de otras partículas víricas). Mediante la toma de imágenes por AFM antes y después de las indentaciones, se pudieron seguir a lo largo del tiempo los cambios producidos en las partículas.

Las cápsidas de MVM resistieron en general un número elevado (a veces superior a 50 indentaciones de fuerza elevada) y toma repetida de imágenes sin que se produjera ninguna alteración estructural permanente detectable. Sin embargo, eventualmente se produjeron alteraciones estructurales permanentes en las cápsidas repetidamente indentadas. En muchos de estos casos, las cápsidas mostraron únicamente alteraciones estructurales locales, sin rotura completa de la partícula. De estos casos, 77 se analizaron en detalle.

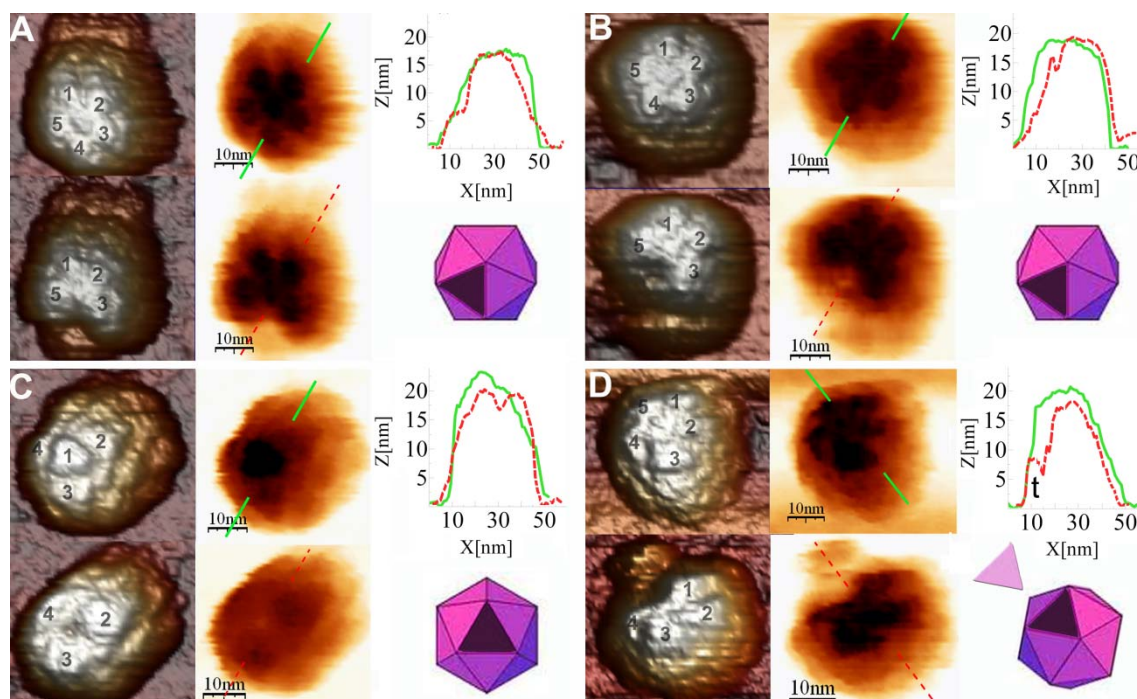


Figura 15. Cápsidas de MVM que pierden un trímero. En cada panel se muestran imágenes de AFM de cápsidas antes (*arriba*) y después de perder un trímero (*abajo*). Cada panel muestra imágenes con relieve enfatizado ("3D"), donde están numerados los trimeros de la parte superior de la cápsida (*izquierda*); imágenes negativas de la misma partícula (*centro*); un perfil de altura de la cápsida siguiendo el trazado indicado sobre las imágenes negativas, por una línea verde (cápsida antes de perder un trímero) o roja (cápsida después de perder un trímero) (*derecha arriba*); y un esquema de la cápsida después de perder un trímero (*derecha, abajo*). Los paneles **A**, **B** y **D** muestran tres cápsidas diferentes con un eje S5 en la parte superior; en el panel **D**, el perfil de alturas sugiere que el trímero perdido se encuentra al lado de la cápsida. En el correspondiente perfil de altura, *t* identifica un trímero. El panel **C** muestra una cápsidas orientadas con un eje S3 en su parte superior.

Disociación de un único trímero. De estas 77 cápsidas analizadas en detalle, 53 de ellas perdieron un trímero de subunidades (Figura 15). En la imagen de AFM de una partícula intacta de MVM, cada trímero cercano al centro de la imagen puede identificarse por la presencia de una gran protuberancia (la espícula) en el centro del mismo (Figuras 3 y 7). Al comparar las imágenes individuales de cada una de estas 53 cápsidas antes y después de las indentaciones a las que se la sometió, se observó claramente que faltaba uno de los trimeros, apreciándose una notable disminución de altura en el lugar donde este faltaba, quedando un hueco en el lugar que había ocupado en la cápsida intacta (Figura 15). En unos pocos casos, el trímero eliminado pudo ser observado al lado de la cápsida (Figura 15.d). En imágenes de AFM, las anchuras medidas directamente pueden ser mayores de las reales debido a la geometría del contacto punta-muestra, pero las alturas son muy fiables. Gracias a ello se pudo comprobar que estos cuerpos que aparecían al lado de cápsidas casi intactas presentaban la anchura y, sobre todo, la altura ($\approx 8\text{nm}$) de

un trímero (Figura 15.d). La altura de las partículas en las que se observa la pérdida de un trímero indica que, muy probablemente, no se han perdido trímeros adicionales en su hemisferio invisible en la imagen. Las cápsidas que habían perdido un trímero fueron, en general, capaces de soportar nuevas indentaciones de fuerza elevada sin colapsar inmediatamente, aunque se apreció una mayor tendencia al colapso que para las cápsidas intactas.

Disociación secuencial de dos trímeros. En 10 de las 77 cápsidas estudiadas en detalle se pudo identificar la pérdida no de uno, sino de 2 trímeros. En al menos una ocasión, la pérdida del segundo trímero ocurrió después de indentaciones adicionales (Figura 16). Este resultado sugiere que el desensamblaje puede proceder a través de la pérdida secuencial de trímeros individuales.

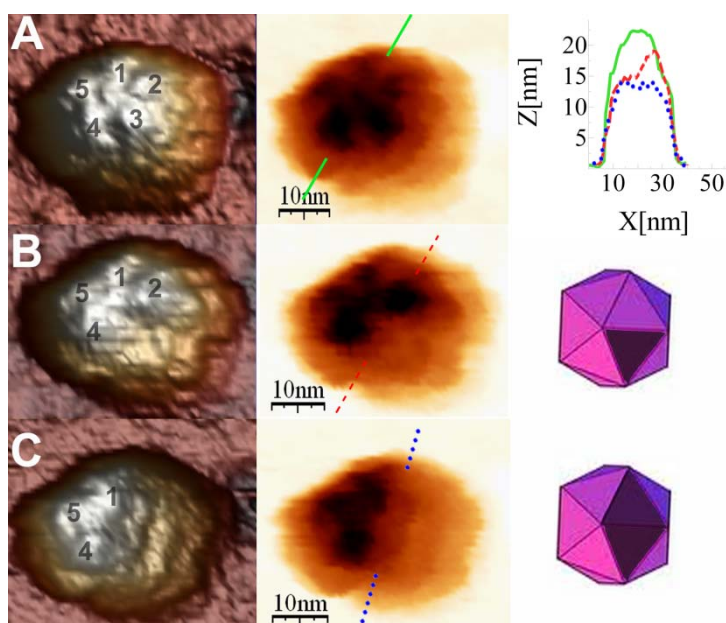


Figura 16. Cápsida de MVM que pierde dos trímeros de modo secuencial.

La organización de la figura es como para cada uno de los paneles de la Figura 15. **A)** cápsida entera; **B)** la misma cápsida tras perder un trímero; **C)** la misma cápsida tras perder un segundo trímero. Los correspondientes perfiles de altura se muestran en verde, rojo y azul.

Disociación de pentámeros de trímeros. En 14 de los 77 cápsidas analizadas en detalle, las indentaciones dieron lugar a la eliminación de subunidades que eran claramente mayores que un trímero individual (Figura 17). La disociación de estas subunidades de mayor tamaño ocurrió con una frecuencia claramente menor que la frecuencia con que se disociaban trímeros individuales (aproximadamente 1:3). Con cierta frecuencia, las estructuras disociadas pudieron observarse al lado de la cápsida de la que se habían disociado. Estas subunidades correspondieron casi siempre a pentámeros de trímeros, como pudo deducirse de su tamaño, forma, simetría pentagonal y altura (Figura 17.C). Las cápsidas a las que les faltaba un pentámero de trímeros, a pesar de haber

perdido una cuarta parte de las subunidades que las forman, presentaron estabilidad suficiente como para poder realizar imágenes sucesivas de las mismas. Sin embargo, resultaron ser mucho menos estables que aquellas que sólo habían perdido un trímero, y en general colapsaron tras la toma de alguna imagen adicional.

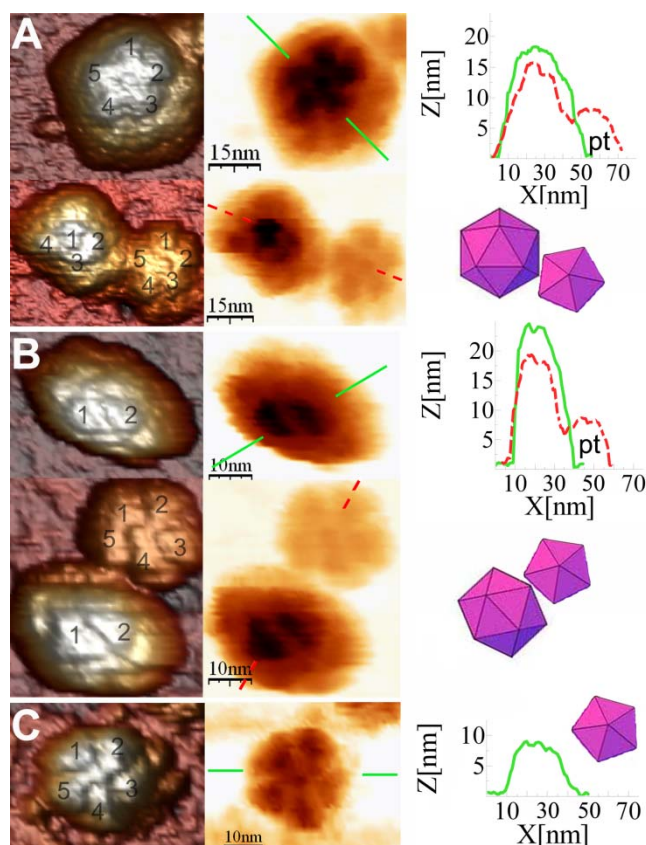


Figura 17. Cápsidas de MVM que pierden un pentámero de trímeros. La organización de los paneles **A** y **B** es como para cada uno de los paneles de la Figura 15. En ambos paneles, se observa una cápsida antes (arriba) y después (abajo) de perder un pentámero de trímeros. En ambos casos, el pentámero disociado se observa al lado de la cápsida. El panel **C** muestra las imágenes y perfil de altura obtenidos para un pentámero aislado. En los perfiles de altura, pt identifica un pentámero de trímeros

Colapso de la cápsida. Muchas cápsidas sufrieron grandes pérdidas de integridad después de ser sometidas a indentaciones e imágenes repetidas, que condujeron a la aparición de fragmentos de diversos tamaños en el lugar donde se encontraba originalmente la cápsida (Figura 18). Estos casos de ruptura generalizada de la cápsida pudieron ser achacados muchas veces a fuerte estrés mecánico, producido en eventos que implicaban la aplicación de fuerzas elevadas, indentaciones más profundas, adhesión entre punta y cápsida, o movimientos incontrolados de la micropalanca. El colapso de algunas cápsidas individuales se analizó en detalle.

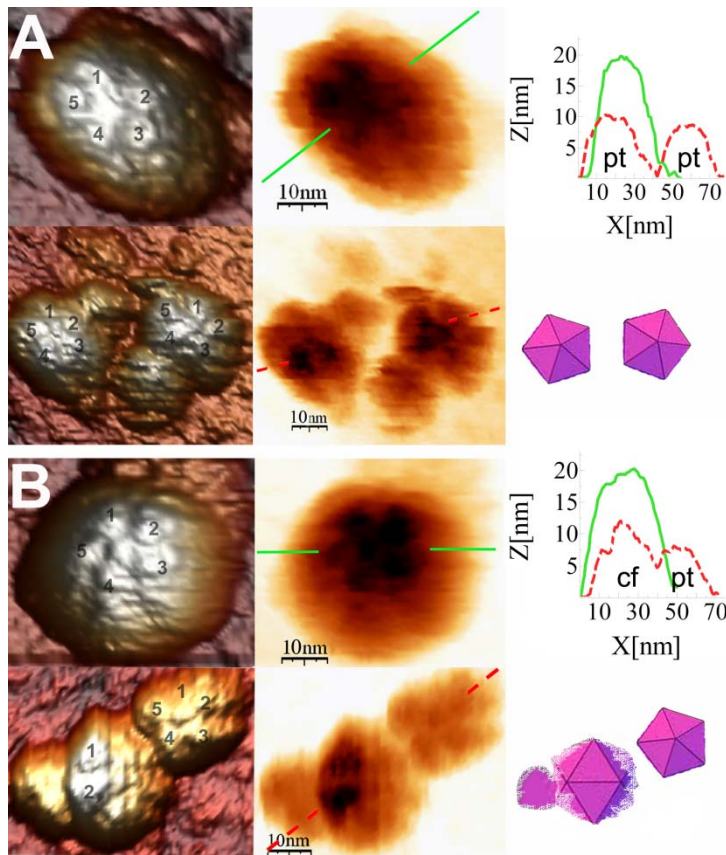


Figura 18. Cápsidas de MVM que sufren un colapso global. La organización de cada panel (A, B) es como para cada uno de los paneles de la Figura 15. Ambos paneles muestran cápsidas originalmente orientadas con un eje S5 en su parte superior, antes (arriba) y después (abajo) de sufrir un colapso global inducido mecánicamente. En los perfiles de altura, cf identifica la cápsida incompleta, y pt pentámeros de trímeros

En algunos casos, el proceso pudo seguirse a lo largo de una serie de indentaciones (Figura 19), reflejando un desensamblaje secuencial de una cápsida, desde su forma intacta hasta que no quedaron fragmentos mayores que un pentámero de trímeros. En el caso particular mostrado en la Figura 19, el colapso no fue producido por un solo evento de fuerte estrés mecánico, sino a través de indentaciones sucesivas sobre la estructura remanente de la cápsida según se iba fragmentando. Durante este proceso controlado de desensamblaje se pudo identificar la disociación de trímeros individuales y de pentámeros de trímeros (Figura 19.B y C).

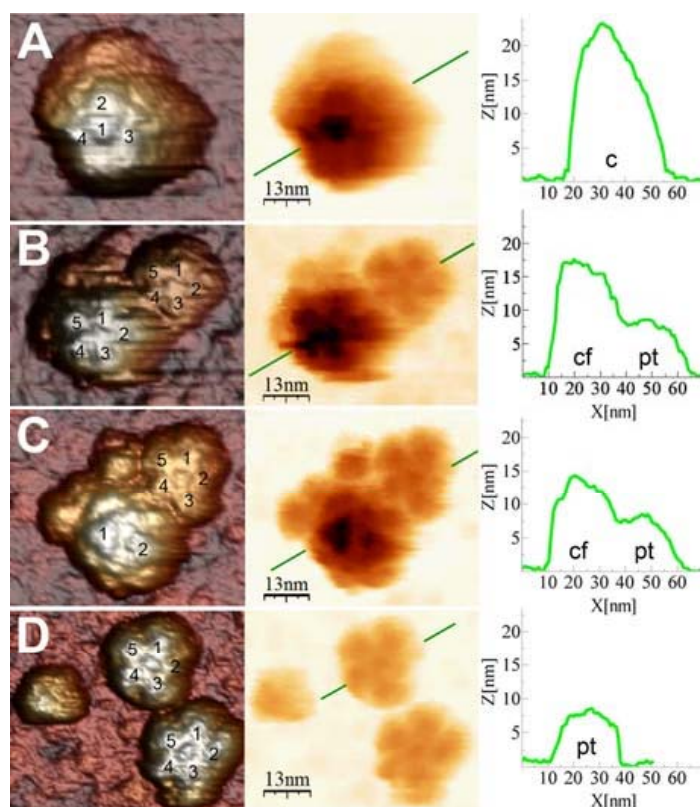


Figura 19. Cápsida de MVM que sufre un desensamblaje secuencial completo. La organización de la figura es similar a la de la Figura 16. **A)** cápsida intacta orientada con un eje S3 en su parte superior; **B)** la misma cápsida tras perder un pentámero de trímeros; **C)** la misma cápsida tras perder varios fragmentos adicionales. **D)** Estado final de la cápsida tras múltiples indentaciones sobre los distintos fragmentos que se fueron generando. Se identifican dos pentámeros, uno de los cuales parece haber perdido un trímero. En los perfiles de altura, c identifica la cápsida, cf la cápsida incompleta, y pt un pentámero de trímeros.

En otro caso particular de colapso completo (Figura 20), la cápsida resultó aplastada pero permaneció adherida al sustrato, de forma que se pudieron contar 15 o 16 de los 20 trímeros que forman una cápsida completa. La estructura aplastada se parecía a una lámina continua de caras triangulares, como los patrones bidimensionales recortables que se utilizan para construir un icosaedro, con los trímeros ubicados en posiciones similares a las de las caras en el patrón del icosaedro (Figura 20.D).

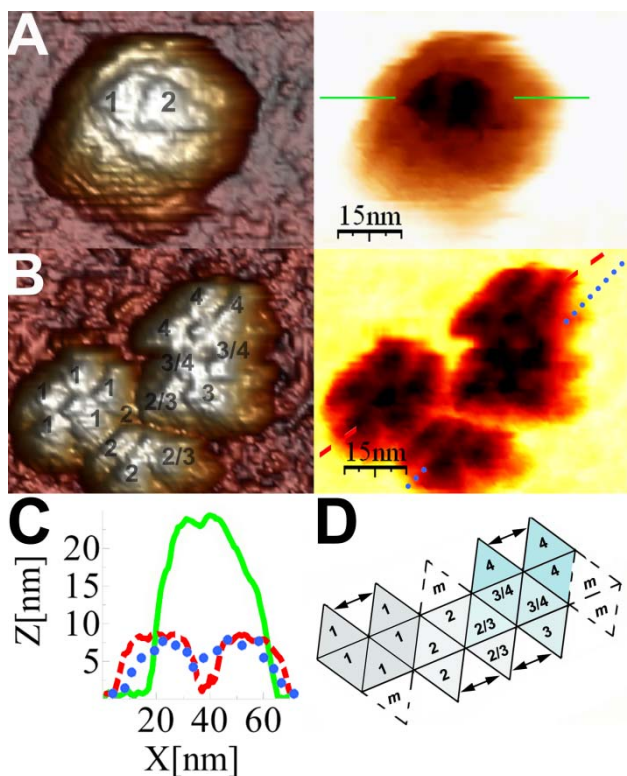


Figura 20. Cápsida de MVM aplastada sin pérdida sustancial de subunidades.

A) Imágenes 3D y negativa de la cápsida intacta, orientada con un eje S2 en la parte superior. **B)** imágenes 3D y negativa de la misma cápsida tras sufrir aplastamiento mecánico por la punta del AFM, con los capsómeros numerados en la imagen 3D. **C)** perfiles de altura trazados a lo largo de las líneas indicadas sobre la cápsida intacta (verde) o aplastada (rojo y azul); la máxima altura de los fragmentos corresponde aproximadamente a la de pentámeros de trímeros. **D)** Patrón bidimensional para la construcción de un icosaedro, con la numeración coincidente con los capsómeros observables en el panel B. Las flechas negras conectan interfases que no están unidas en el modelo, pero que parecen estarlo en la cápsida aplastada. Los capsómeros no identificables o perdidos en la cápsida aplastada se indican con una *m* (missing) en el patrón bidimensional.

4.2.2. Energía disipada durante la disociación mecánica de subunidades de la cápsida

La eliminación de un único trímero de la cápsida de MVM se produjo habitualmente tras la realización de un gran número de indentaciones (30 a 100) de poca profundidad (≈ 2 nm) sobre las cápsidas. En cambio, la eliminación de pentámeros de trímeros generalmente se produjo tras pocas indentaciones (< 15), pero de mayor profundidad (≈ 5 nm). Además, cuando la eliminación de un trímero se pudo asociar con seguridad a una indentación concreta, la curva fuerza-indentación correspondiente mostró un único salto en el régimen lineal (Figura 10.b). En cambio, aquellas que pudieron ser asociadas a pérdidas de un pentámero de trímeros mostraron más de un salto sobre el régimen lineal (Figura 10.c).

Tanto en el caso de uno como en el de varios saltos en el régimen lineal, correspondientes respectivamente a uno o más procesos de disociación de subunidades (como se comprobó mediante la toma de imágenes antes y después del evento), se calculó la energía disipada como se describe en el apartado 3.13.6, siguiendo el método descrito

anteriormente para otros ensamblados biológicos (Schaap *et al.*, 2006; Ivanovska *et al.*, 2011). Los valores medios obtenidos para la energía total disipada fueron $3,6 \times 10^{-19}$ J (217 kJ/mol) para la disociación de un único trímero, y $6,1 \times 10^{-19}$ J (367 kJ/mol) para la disociación de un pentámero de trímeros. Si tenemos en cuenta que la eliminación de un solo trímero implica la ruptura de 3 interfases intertriméricas, y asumimos aditividad en el proceso, la energía necesaria para disrupción de una interfase intertrimérica sería $217/3 = 72$ kJ/mol. Si utilizamos dicho valor para el cálculo de la energía disipada durante la eliminación de un pentámero de trímeros, que implica la ruptura de 5 interfases intertrímero, el resultado es de $72 \times 5 = 360$ kJ/mol, un valor casi idéntico al obtenido experimentalmente.

4.2.3. Desensamblaje mecánico de viriones

Los viriones de MVM tienen segmentos de ADNcs unidos a la pared interna de la cápsida (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998), que refuerzan mecánicamente la regiones próximas a las zonas de contacto del ADN (Carrasco *et al.*, 2006; Carrasco *et al.*, 2008). Para comprobar si dicho refuerzo mecánico provocado por el ADN podía influir en el desensamblaje del virión respecto a la cápsida vacía se estudiaron cerca de 200 viriones individuales. Igual que sucedía con las cápsidas, los viriones generalmente soportaron un gran número de indentaciones sin sufrir ningún cambio estructural, pero suficientes indentaciones de fuerza elevada y/o toma repetida de imágenes eventualmente provocaron su desensamblaje parcial o total.

Nueve de los casos estudiados fueron analizados en detalle. En seis casos se pudo apreciar una partícula casi intacta tras la pérdida de subunidades y, en cuatro de ellos, solo se perdió un trímero (resultados no mostrados). En un caso se perdieron dos trímeros de forma consecutiva y en otro caso se perdió un pentámero de trímeros. En otros tres casos la partícula vírica sufrió un colapso generalizado, produciendo al menos un pentámero de trímeros, entre otros fragmentos. Los datos de desensamblaje mecánico de viriones obtenidos hasta el momento no tienen suficiente peso estadístico, pero indican que no parecen existir diferencias cualitativas en el desensamblaje mecánico de cápsidas vacías o viriones.

En resumen, los experimentos de desensamblaje mecánico de partículas de MVM han permitido identificar experimentalmente intermediarios de desensamblaje consistentes en cápsidas a las que le falta un trímeros de VPs, más de un trímero, o un pentámero de trímeros, y también pentámeros de trímeros y trímeros libres. En la

Discusión compararemos estos resultados experimentales con las predicciones teóricas existentes sobre la ruta de ensamblaje y desensamblaje de virus icosaédricos sencillos.

4.3. Relación entre rigidez mecánica local y resistencia a la inactivación térmica del virión de MVM

El tercer objetivo de esta tesis consistió en la investigación de una posible conexión cuantitativa entre la rigidificación mecánica local del virión de MVM causada por segmentos del ADN unidos a la pared interna de la cápsida (Carrasco *et al.*, 2006; Carrasco *et al.*, 2008), y la estabilización del virión frente a la inactivación térmica de su infectividad (Reguera *et al.*, 2005). Este estudio se ha realizado en colaboración con la Dra. M. Castellanos. El autor de esta memoria continuó y completó los experimentos y los análisis realizados por La Dra. Castellanos en nuestro grupo. En esta memoria se describen los resultados completos obtenidos por ambos investigadores.

4.3.1. La eliminación de diferentes interacciones entre la cápsida y el ADN en el virión de MVM reduce en un grado diferente la resistencia mecánica local del virus

En primer lugar se analizó la estructura cristalográfica del virión de MVM (Kontou *et al.*, 2005) para seleccionar residuos cuya sustitución individual a alanina eliminara diversas interacciones entre la cápsida y el ADN. Se eligieron los residuos D58, N183, W60, T267 y N491. La mutación a alanina de cualquiera de los tres primeros residuos elimina interacciones con las cuñas de ADN presentes en el interior de la cápsida que son presumiblemente más fuertes que las que establecen los dos últimos. Las mutaciones D58A y N183A eliminan puentes de hidrógeno, mientras que la mutación W60A reduce notablemente el número de contactos hidrófobos. Por otra parte las mutaciones N491A y T257A sólo eliminan algunos contactos de van de Waals.

La eliminación de cualquiera de estos cinco residuos no elimina interacciones significativas con otros residuos de la cápsida, ni introduce grupos que puedan generar nuevas interacciones. Por tanto los efectos observados por las mutaciones pueden atribuirse a la eliminación de interacciones entre la cápsida y el ADN, como ya se había comprobado anteriormente para dos de las mutaciones elegidas (Carrasco *et al.*, 2008). Además la mayoría de estos residuos están conservados en otros parvovirus relacionados, como CPV (Chapman y Rossmann, 1993), lo cual apoya su importancia biológica.

Las mutaciones se introdujeron en el clon infeccioso (apartado 3.3.2), y se determinó el título de los viriones producidos (apartado 3.1.5), normalizando siempre frente al control no mutado. Todos los mutantes excepto N183A resultaron casi tan infecciosos como el parental (Tabla 5). La reducción de título para N183A fue moderada, permitiendo producir suficiente cantidad de partículas víricas para llevar a cabo los análisis.

Tabla 5. Mutantes utilizados para el estudio de la relación entre propiedades mecánicas de MVM y resistencia a inactivación térmica, e infectividad de los mismos.

Virión ^a	Infectividad relativa ^b	Constante de inactivación relativa k_{in} ^c
Control no mutado	1	1
<i>Mutaciones en sitios de interacción con el ADN</i>		
D58A	0,45 ± 0,07	7,00 ± 1,96
W60A	0,39 ± 0,19	8,05 ± 0,91
N183A	0,15 ± 0,01	9,00 ± 2,54
T267A	0,43 ± 0,09	1,73 ± 0,25
N491A	1,17 ± 0,05	2,09 ± 0,83
D58A/N183A	0,01 ± 0,01	3,40 ± 0,67
<i>Mutaciones en cavidades</i>		
L113F	0,88 ± 0,20	0,90 ± 0,06
L143F	0,99 ± 0,13	1,03 ± 0,18
<i>Mutaciones en sitios de interacción con el ADN y en cavidades</i>		
D58A/L113F	<i>no infectivo</i>	<i>no aplica</i>
D58A/L143F	0,05 ± 0,02	3,45 ± 0,32
N183A/L113F	0,03 ± 0,01	4,16 ± 1,76
N183A/L143F	0,08 ± 0,02	3,85 ± 1,93

^a se indica el mutante utilizado y la región de la cápsida en la que se encuentra. ^b Infectividad relativa del mutante respecto a la del control no mutado. ^c Constante de velocidad de inactivación térmica relativa a la del control no mutado. Para los valores de infectividad y constante de inactivación se indican medias de dos o más experimentos independientes y la desviación estándar.

Los viriones mutantes y el control no mutado se produjeron y purificaron como se detalla en el apartado 3.5.3. A continuación se llevaron a cabo experimentos de indentación mediante AFM utilizando la aproximación descrita en el apartado 3.13.5. Tras identificar la orientación de cada partícula individual a analizar mediante la realización de imágenes de alta resolución, se realizaron sobre la misma indentaciones con fuerza elevada (aproximadamente 1 nN) sobre una zona aproximadamente centrada en alguno de los ejes de simetría. Las medidas se realizaron para muchos viriones individuales, y los resultados obtenidos para la constante elástica k_s para cada tipo de simetría (S2, S3 o S5) (Figuras 21 y 22) se promediaron (Tabla 6).

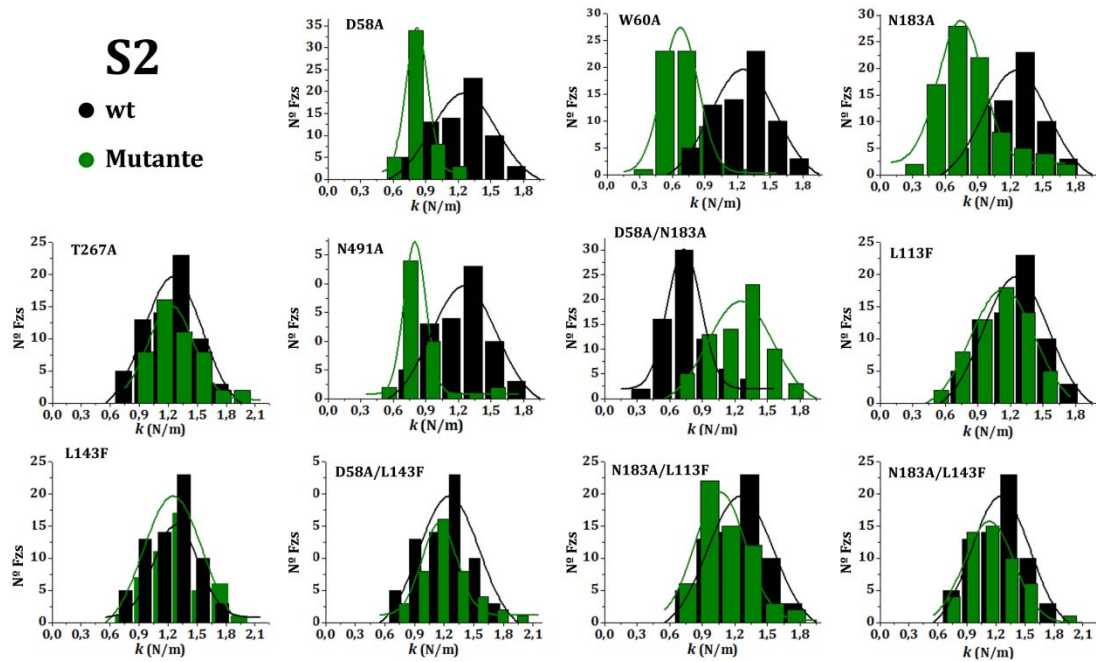


Figura 21. Comparación de la rigidez mecánica de viriones de MVM en regiones S2. Cada histograma representa la distribución del valor de k_s obtenido para el control no mutado (wt, en negro) y uno de los mutantes analizados (en verde, identificado en la parte superior de la gráfica) en los que se han eliminado interacciones cápsida-ADN y/o modificado el tamaño y forma de las cavidades mayores.

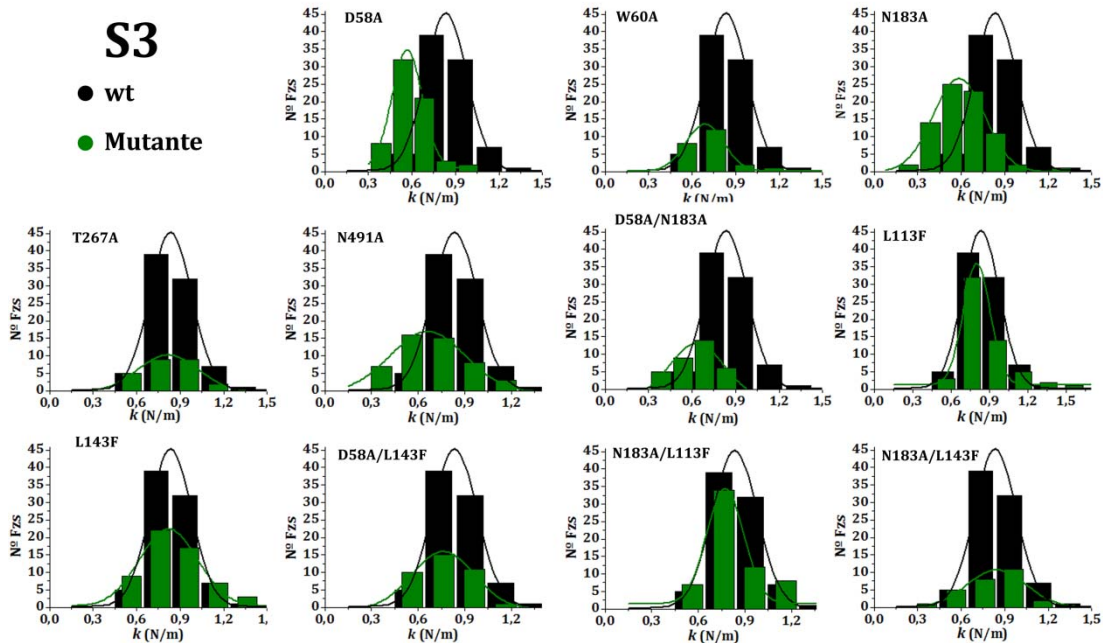


Figura 22. Comparación de la rigidez mecánica de viriones de MVM en regiones S3. Cada histograma representa la distribución del valor de k_s obtenido para el control no mutado (wt, en negro) y uno de los mutantes analizados (en verde, identificado en la parte superior de la gráfica) en los que se han eliminado interacciones cápsida-ADN y/o modificado el tamaño y forma de las cavidades mayores.

Tabla 6. Efectos de las mutaciones analizadas sobre la rigidez mecánica del virión de MVM en regiones S2, S3 y S5.												
Mutante	S2				S3				S5			
	k_s (N/m) ^a	Fz ^b	n ^c	t ^d	k_s (N/m) ^a	Fz ^b	n ^c	t ^d	k_s (N/m) ^a	Fz ^b	n ^c	t ^d
wt	1,25±0,25	68	12	-	0,85±0,15	78	11	-	0,59±0,10	69	8	-
<i>Mutantes en sitios de interacción con el ADN</i>												
D58A	0,82±0,10	46	5	9,9x10 ⁻¹³	0,57±0,10	66	7	1,2x10 ⁻¹⁴	0,55±0,06	64	6	0,05
W60A	0,68±0,15	52	4	1,7x10 ⁻²⁹	0,70±0,15	23	6	1,3x10 ⁻⁴	0,61±0,19	36	4	0,44
N183A	0,74±0,19	88	12	2,0x10 ⁻¹¹	0,58±0,15	79	15	1,2x10 ⁻¹¹	0,57±0,10	34	8	0,8
T267A	1,18±0,26	48	8	0,17	0,81±0,17	25	6	0,27	0,56±0,10	48	9	0,23
N491A	0,86±0,21	40	5	1,4x10 ⁻¹³	0,69±0,23	44	6	1,0x10 ⁻⁴	0,60±0,11	25	4	0,57
D58A/N183A	0,79±0,23	70	9	2,3x10 ⁻¹⁴	0,64±0,16	35	5	1,8x10 ⁻⁰⁸	0,58±0,19	87	6	0,4
<i>Mutantes en cavidades</i>												
L113F	1,12±0,25	60	9	0,003	0,89±0,20	58	8	0,3	0,55±0,11	64	6	0,02
L143F	1,34±0,26	48	6	0,07	0,88±0,22	57	10	0,47	0,57±0,11	49	7	0,46
<i>Mutantes en sitios de interacción con el ADN y en cavidades</i>												
D58A/L143F	1,11±0,25	42	8	0,004	0,77±0,16	37	8	0,01	0,57±0,11	63	7	0,27
N183A/L113F	1,03±0,23	60	5	9,4 x10 ⁻⁷	0,78±0,18	61	4	0,01	0,58±0,12	17	2	0,79
N183A/L143F	1,03±0,26	50	7	1,5 x10 ⁻⁵	0,81±0,19	27	4	0,26	0,61±0,11	43	6	0,34

^a Constante elástica promedio y desviación estándar; ^b número total de indentaciones realizado sobre partículas con la misma mutación en la misma región; ^c número total de partículas analizado para una misma mutación y región; ^d resultado del análisis estadístico *t-student* con un nivel de confianza del 95%.

Los cinco viriones mutantes rindieron valores de k_s en regiones S5 que eran indistinguibles del valor obtenido para el control no mutado; lo mismo se observó con cualquier otro virión infeccioso mutante utilizado en este estudio (Tablas 6 y 9). Este resultado se esperaba del vínculo que ya habíamos encontrado entre la conservación de la elasticidad mecánica en las regiones S5 donde se localizan los poros, y la viabilidad del virus (Castellanos *et al.*, 2012a).

Por otra parte, las cinco mutaciones produjeron diferentes efectos sobre la rigidez mecánica del virión en las regiones S2 y S3, que incluyen los sitios de unión al ADN (Figura 8 y Tabla 6). Los resultados (Figuras 21 y 22) rindieron para algunos mutantes valores de k_s promedio y distribución de valores que eran claramente diferenciables y estadísticamente significativas, según el estadístico *t-student*, de los obtenidos para el virión parental. Las mutaciones D58A, N183A y W60A, que eliminan las interacciones ADN-cápsida más energéticas, causaron mayores reducciones en los valores de k_s en estas regiones, acercándose más a los valores relativamente bajos de k_s de la cápsida vacía, a pesar de que todo el ADN se encontraba todavía dentro de dichos viriones mutantes. Las mutaciones que eliminan interacciones ADN-cápsida más débiles, produjeron reducciones menores de la rigidez de las regiones S2 y S3 (N491A), o tuvieron un efecto insignificante sobre la rigidez del virión (T267A).

La mutación doble D58A/N183A redujo claramente la infectividad del virión (Tabla 5), pero el título de viriones producidos fue suficiente para realizar su análisis mecánico. La reducción de la rigidez mecánica en este mutante no fue mayor que la de los mutantes sencillos D58A y N183A, revelando un efecto mecánico no aditivo de estas mutaciones, esperable por la proximidad de estos dos residuos.

4.3.2. Relación exponencial entre resistencia a inactivación térmica del virión de MVM y rigidez mecánica local debida a interacciones cápsida-ADN

Experimentos previos indirectos de nuestro laboratorio sugerían que la inactivación del virión de MVM cuando es sometido a calentamiento (70°C) se debe a algún tipo de cambio conformacional, antes de que la partícula se disocie (Reguera *et al.*, 2005). Hemos confirmado directamente esta posibilidad realizando experimentos de inactivación térmica del virión y estimado la proporción de partículas íntegras remanentes mediante microscopía electrónica (Figura 23). El resultado mostró que la inactivación térmica del virión progresa mucho más rápidamente que la disociación de la partícula: cuando ya se

han inactivado el 99 % de los viriones, un 50 % de las partículas todavía mantiene su integridad estructural.

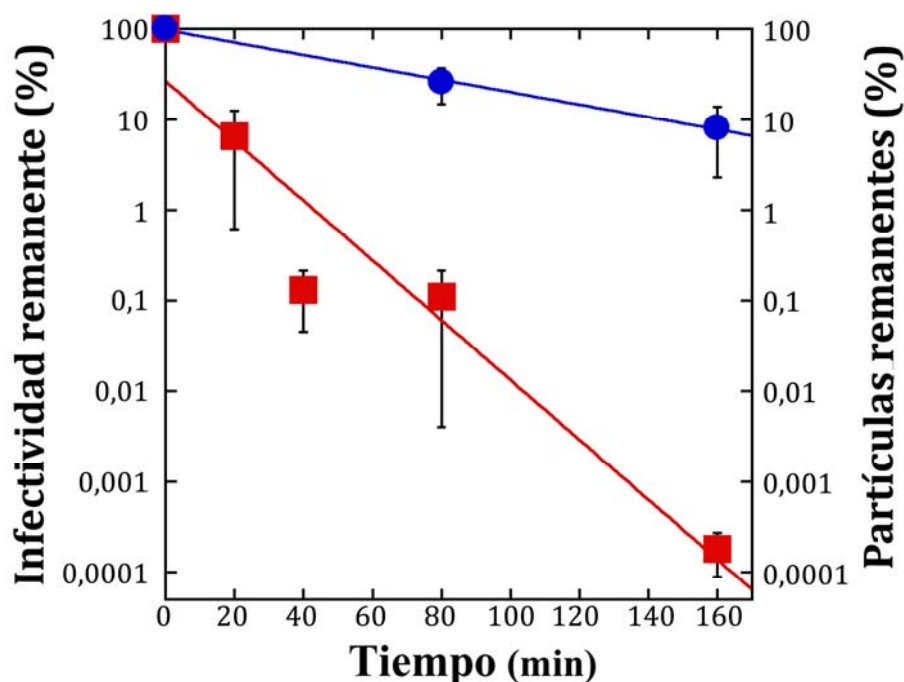


Figura 23. Cinéticas de inactivación de infectividad y disociación de viriones de MVM a 70 °C. Círculos azules: partículas víricas remanentes, cuantificadas por ME. Cuadrados rojos: viriones infectivos remanentes.

Para establecer si existe una relación cuantitativa entre resistencia del virión de MVM frente a la inactivación térmica y la rigidez mecánica de las regiones S2 y S3 que engloban los sitios de unión cápsida-ADN, la Dra. Castellanos en nuestro grupo determinó las constantes de velocidad de inactivación, k_{in} , a 70°C del virión no mutado y de los mutantes D58A, N183A, N491A, T267A y D58A/N183A (utilizando en cada experimento el virión no mutado como control interno), del modo que se describe en el apartado 3.9.

Para el virión no mutado, la media obtenida de varios experimentos realizados en las mismas condiciones fue: $k_{in} = 5,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. La constante de inactivación térmica en esas condiciones obtenida para cada mutante se normalizó respecto a la obtenida para el parental en el mismo experimento en las mismas condiciones, y se promediaron los resultados de dos o tres experimentos independientes. Las constantes de velocidad de inactivación relativas así determinadas se indican en la Tabla 5.

Los seis mutantes ensayados redujeron su resistencia frente a la inactivación por calor en diferentes medidas, rindiendo una k_{in} que fue entre 2 y 9 veces mayor que la del virión no mutado (Figura 23 y Tabla 5). Al igual que lo que ocurrió para las reducciones de

rigidez local, aquellos mutantes que eliminaban interacciones cápsida-ADN más energéticas (D58A, N183A, W60A y D58A/N183A) mostraron mayores aumentos de k_{in} que los que eliminaban interacciones menos energéticas (N491A y T267A).

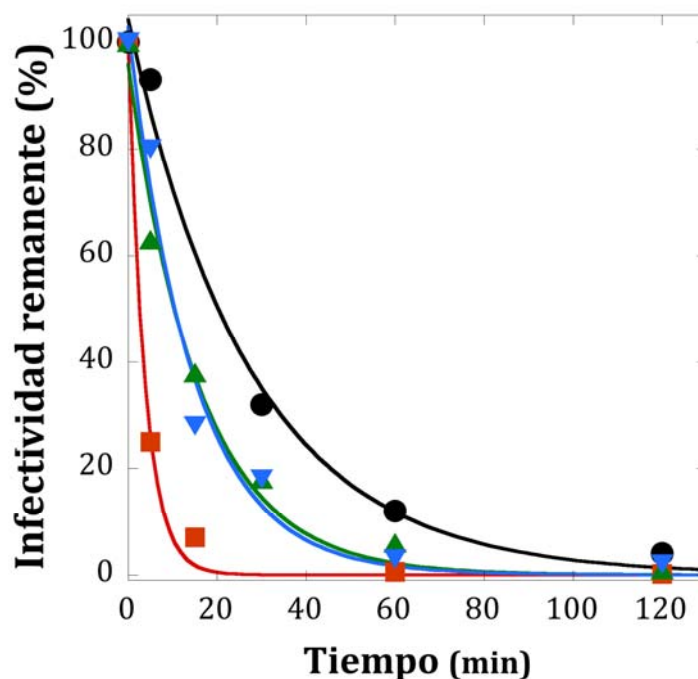


Figura 24. Cinéticas de inactivación a 70°C de algunos mutantes de MVM. Se muestran resultados representativos para el virión no mutado (círculos negros), y mutantes W60A (cuadrados rojos), T267A (triángulos invertidos azules) y N491A (triángulos verdes). Los ajustes de los datos a procesos de decaimiento exponencial se indican mediante líneas continuas. Los valores obtenidos para las constantes de inactivación para estos y los demás mutantes analizados se indican en la Tabla 5.

Una comparación cualitativa de los datos de k_{in} y k_s para cada virión (Tablas 5 y 6) reveló una relación entre la reducción de la resistencia a la inactivación por calor y las reducciones locales de rigidez mecánica en las regiones más cercanas a los sitios de interacción cápsida-ADN (regiones S2 y S3). A continuación probamos si dicha relación podía expresarse de forma cuantitativa representando los valores de k_{in} frente k_s para todos los mutantes y el virión no mutado. Como medida de la rigidez local en las zonas de interacción con el ADN promediamos los valores de k_s obtenidos para los ejes de simetría S2 y S3. El resultado (Figura 25) reveló para el virión de MVM una relación cuantitativa exponencial entre la resistencia a inactivación térmica (medida por la constante de inactivación térmica k_{in}) y la rigidez mecánica de las zonas S2 y S3 (medida por la constante elástica media k_s). Esta misma relación exponencial simple se mantuvo (aunque los coeficientes de correlación fueron un poco menores) cuando se calculó a partir de los datos de k_s obtenidos para las regiones S2 o S3 por separado, en lugar de conjuntamente.

En la discusión se proporciona un marco conceptual, basado en la teoría del estado de transición de una reacción, para explicar ésta relación cuantitativa empírica entre la disminución de la rigidez mecánica de ciertas zonas del virión de MVM y la disminución de su resistencia a la inactivación térmica, y se discuten sus implicaciones biológicas.

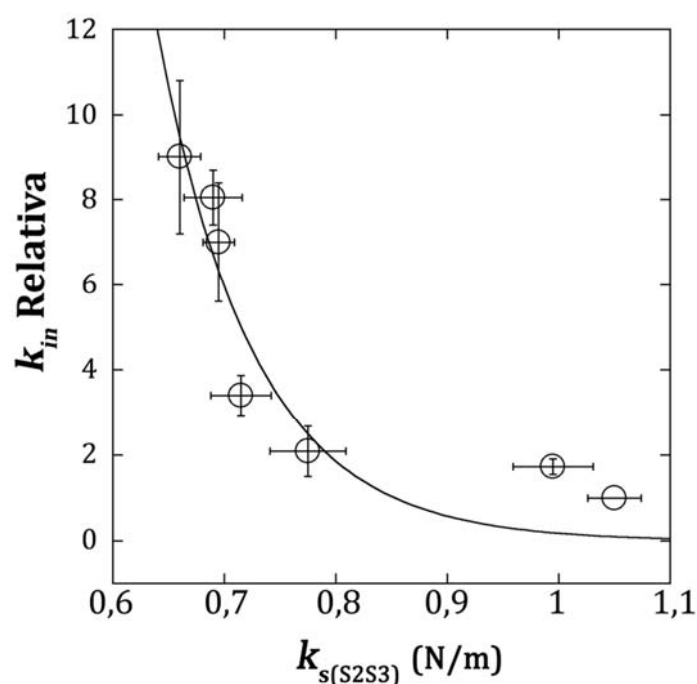


Figura 25. Relación entre constante de inactivación térmica (k_{in}) y rigidez mecánica en las regiones S2/S3 ($k_{s(S2S3)}$) para diferentes viriones mutantes de MVM. De izquierda a derecha, los puntos en el gráfico corresponden a: N183A, W60A, D58A, D58A/N183A, N491A, T267A y control no mutado; se indican valores medios y errores estándar. Los datos se ajustaron a una curva exponencial sencilla con $k_{in}=0$ a $k_{s(S2S3)}=\infty$ (ver texto).

4.3.3. Los aumentos de rigidez provocados por el establecimiento de interacciones cápsida-ADN o el relleno de cavidades no son aditivos

Como se ha mencionado anteriormente (apartado 1.6.1), en el interior de cada subunidad de la cápsida de MVM se han identificado regiones pobremente empaquetadas que delimitan pequeñas cavidades. Las mayores de estas cavidades (Carreira y Mateu, 2006) pueden alojar varias moléculas de agua, y se encuentran cerca de las regiones de la cápsida que unen segmentos de ADN (Figura 8). Sustituciones de aminoácidos que cambian la forma y/o el volumen de la cavidad mayor en cada subunidad alteran las propiedades mecánicas de la cápsida vacía (VLP) (Castellanos *et al.*, 2012a). La elasticidad de las regiones de S5 de la cápsida no varió significativamente, pero la rigidez de las regiones de S2 y S3 aumentó de modo notable, llegando a duplicar el valor de la constante

elástica. Este efecto mecánico es comparable al producido en el virión por la interacción entre los segmentos de ADN y la cápsida (Carrasco et al., 2006; Carrasco et al., 2008). Decidimos analizar si las mutaciones que alteran la forma y volumen de estas cavidades tienen asimismo un efecto sobre la rigidez del virión y, en su caso, si los efectos mecánicos de la alteración de cavidades y de las interacciones ADN-cápsida pueden combinarse para producir viriones aún más rígidos (y térmicamente más resistentes).

Para ello se produjeron y titularon viriones de MVM en los que se habían introducido las mutaciones L113F o L143F, las cuales disminuyen el volumen de las 60 cavidades mayores equivalentes (Carreira y Mateu, 2006) y rigidifican notablemente las regiones S2 y S3 de la cápsida vacía (Castellanos et al., 2012a). Ambos viriones mutantes presentaron una infectividad similar a la del no mutado (Tabla 5) y pudieron utilizarse en ensayos mecánicos. A diferencia de lo observado con cápsidas vacías, ninguna de las dos mutaciones produjo un cambio significativo en el valor de k_s (Tabla 6 y Figuras 21 y 22). Por tanto, cuando la rigidez de las regiones S2 y S3 de la cápsida mutante ya está aumentada mediante la intriducción de mutaciones de relleno de cavidades, la encapsidación del ADN y su unión a las paredes de la cápsida no ejerce ningún efecto adicional sobre la rigidez mecánica del virión.

Éstos resultados nos permitieron someter de nuevo a prueba la hipótesis de una correlación entre rigidez de las regiones S2 y S3 en el virión y resistencia del mismo a la inactivación por calor. Puesto que las mutaciones L113F y L143F no aumentan la rigidez del virión, era esperable que tampoco aumentaran la resistencia de este frente a la inactivación térmica. Los resultados revelaron que las constantes de inactivación k_{in} de estos mutantes son similares a las del virión no mutado, confirmando dicha predicción (Tabla 5).

4.3.4. Las reducciones de la rigidez local y la resistencia a la inactivación por calor provocadas por la eliminación de interacciones cápsida-ADN pueden ser compensadas por las mutaciones de relleno de cavidades

Las mutaciones de relleno de cavidades L113F y L143F rigidificaron las regiones S2 y S3 de la cápsida vacía de MVM, aunque no las del virión, que son rigidificadas mediante interacciones cápsida-ADN. A la vista de estas observaciones, nos planteamos si el incremento de elasticidad del virión causado por eliminación de interacciones cápsida-

ADN podría ser revertido por la introducción de las mutaciones de rellenado de cavidades que actúen de modo compensatorio.

Para ello la Dra. Castellanos diseñó, produjo y tituló los dobles mutantes D58A/L113F, D58A/L143F, N183A/L113F y N183A/L143F. A pesar de que las mutaciones individuales afectan poco o nada al título viral, la combinación de las mismas provocó pérdidas de infectividad. La mutación D58A/L113F resultó letal, pero las otras tres mutaciones dobles redujeron el título moderadamente (entre 10 a 30 veces respecto al parental no mutado) (Tabla 5), por lo que los correspondientes viriones pudieron ser producidos, y su rigidez mecánica determinada.

Los tres dobles mutantes viables rindieron valores de k_s en las regiones S2 y S3 sustancialmente mayores que los de los mutantes individuales en los que se eliminaron interacciones cápsida-ADN, y más parecidos a los obtenidos con el virión no mutado (Tabla 6). Por tanto, en MVM la disminución de rigidez mecánica causada por la eliminación de interacciones entre segmentos de ADN genómico y la cápsida puede ser compensada, al menos parcialmente, por el rellenado de cavidades vecinas.

Éstos resultados permitieron someter a prueba una vez más la hipótesis de una correlación entre rigidez mecánica de las regiones S2 y S3 en el virión y resistencia a la inactivación térmica de la infectividad. Puesto que los viriones dobles mutantes analizados en este apartado recuperan la rigidez en dichas regiones, también deberían recuperar su resistencia a la inactivación por calor. La determinación por la Dra. Castellanos de las constantes de inactivación k_{in} de estos mutantes mostró que, aunque no totalmente, la resistencia a la inactivación térmica se recupera como se esperaba (Tabla 5).

En resumen, los resultados descritos en el apartado 4.3 nos permiten concluir que: i) las interacciones probablemente más energéticas entre cápsida y segmentos de ADN en el virión de MVM contribuyen más que interacciones menos energéticas a aumentar la rigidez mecánica de las regiones S2/S3; ii) existe una relación empírica cuantitativa y exponencial entre el aumento de rigidez mecánica en regiones S2/S3, mediado por las interacciones cápsida-ADN, y la resistencia del virión a la inactivación de su infectividad por calentamiento; iii) las pérdidas de rigidez mecánica y resistencia frente a inactivación térmica del virión de MVM provocadas por la eliminación de interacciones cápsida-ADN, pueden ser compensadas mediante la introducción de mutaciones que rellenan parcialmente cavidades de la cápsida.

4.4. Estudio de determinantes moleculares de las propiedades mecánicas de la cápsida de MVM

El cuarto y último objetivo de esta tesis se centró en el estudio sistemático del papel de residuos individuales e interacciones en las interfases entre trímeros en la rigidez mecánica de la cápsida de MVM. No existen apenas estudios mutacionales que analicen con este nivel de resolución estructural las relaciones entre reconocimiento molecular y propiedades mecánicas de una partícula vírica, o de cualquier ensamblado proteico (apartado 1.5.2). Estos estudios pueden contribuir al desarrollo de estrategias racionales para mejorar la resistencia mecánica de nanopartículas víricas o proteicas para diversas aplicaciones biomédicas o industriales.

4.4.1. Elección de mutaciones para investigar el papel de residuos e interacciones intersubunidad en la rigidez mecánica de la cápsida de MVM

Nuestros estudios previos han revelado que en el virión de MVM las interacciones entre ciertos residuos en la pared interna de la cápsida y segmentos del ADN genómico rigidifican las regiones S2 y S3 de la partícula, pero no las S5 (Carrasco *et al.*, 2008; apartado 1.5.2); y demostrado que esta rigidificación anisotrópica se asocia a una ventaja selectiva del virus, que aumenta su resistencia frente a la inactivación térmica (resultados descritos en el apartado 4.3), sin perder la flexibilidad local alrededor de los poros de la cápsida, que es necesaria para la infectividad del virión (Castellanos *et al.*, 2012a).

Continuando esa línea, nos planteamos investigar en qué medida diferentes residuos implicados en interacciones entre subunidades de la cápsida de un virus contribuyen a la rigidez mecánica de la misma, utilizando de nuevo MVM como modelo. En particular, nos centramos en el análisis del papel de residuos e interacciones en las interfases entre trímeros sobre la rigidez mecánica local y global de la cápsida.

En un análisis sistemático realizado con anterioridad en nuestro laboratorio se había determinado el papel de residuos implicados en interacciones intertriméricas en el ensamblaje de la cápsida de MVM, su estabilidad frente a disociación térmica y su dinámica conformacional asociada a los poros y necesaria para la infección por el virus (Reguera *et al.*, 2004). Para ese estudio se seleccionaron y mutagenizaron individualmente a alanina 28 de los 79 residuos por subunidad cuya cadena lateral (más allá del C β) está implicada en interacciones entre trímeros (Tabla 7). En conjunto, estas mutaciones

eliminan casi todas las interacciones entre trímeros con cierta relevancia energética (Tabla 8).

Para el análisis mediante mutación sistemática a alanina del papel sobre la rigidez mecánica de la cápsida de residuos implicados en la asociación entre trímeros, seleccionamos 12 de estos 28 residuos energéticamente relevantes (resaltados en negrita en la Tabla 7 e identificados en la estructura tridimensional de la cápsida en la Figura 26). Descartamos esencialmente los residuos cuya mutación impide el ensamblaje de la cápsida (Reguera *et al.*, 2004), y también aquellos 5 situados en la base de los poros, cuyo papel en la rigidez mecánica y dinámica conformacional de la cápsida ya habíamos analizado (Castellanos *et al.*, 2012a). Estos 5 últimos residuos (por subunidad) forman un anillo de $5 \times 5 = 25$ residuos alrededor de la base de cada poro en S5 y, aunque igualmente situados en las interfases entre trímeros, se diferencian claramente en cuanto a posición y función de los 12 residuos analizados en el presente estudio (Castellanos *et al.*, 2012a; apartado 1.5.2).

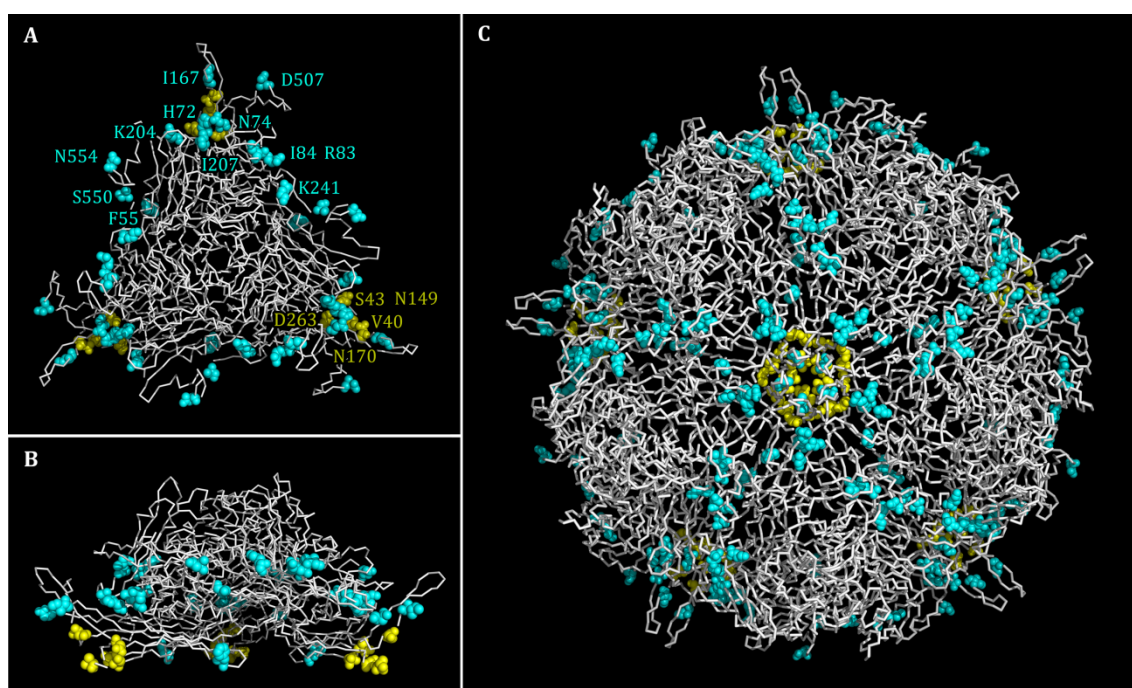


Figura 26. Localización en la estructura de MVM de todos los residuos en las interfases intertriméricas cuyo papel sobre la rigidez mecánica se ha analizado en este estudio. A) trímero visto de frente; **B)** trímero visto de perfil; **C)** pentámero de trímeros visto de frente. En los 3 paneles se muestran en amarillo los residuos interfásicos que forman un anillo en la base de cada poro de la cápsida (centro del pentámero de trímeros), y en color cian los demás residuos interfásicos analizados.

Tabla 7. Residuos localizados en interfases intertriméricas de la cápsida de MVM, y efectos individuales de su mutación a alanina sobre la infectividad del virión

Residuo ^a	C ^b	Infectividad relativa del mutante a alanina ^c
Q129	7	no ensambla
K153	7	no ensambla
W203	7	no ensambla
F247	7	no ensambla
T249	7	no ensambla
Y522	7	no ensambla
W543	7	no ensambla
S43	(bp) 7	$<4 \times 10^{-5}$
N149	(bp) 7	$<8 \times 10^{-7}$
N170	(bp) 7	$<5 \times 10^{-6}$
D263	(bp) 7	$<8 \times 10^{-6}$
V40	(bp) 6	$1,2 \times 10^{-4}$
F526	(bp) 5*	ND
R83	5	$<5 \times 10^{-6}$
H72	7	$<8 \times 10^{-7}$
N74	6	0,093
S550	4	ND
K204	6	1,05
D507	4	$<2 \times 10^{-5}$
K241	1	0,93
F55	4	$<8 \times 10^{-6}$
I84	5*	0,08
I167	6*	0,07
I207	4	0,11
W386	2	ND
L537	6	ND
N554	4*	ND
T569	2	ND

^a Se indica el conjunto de residuos en las interfases entre trímeros cuyo papel en el ensamblaje, estabilidad y dinámica conformacional de la cápsida e infectividad del virión había sido analizado en nuestro laboratorio mediante mutación sistemática a alanina (Reguera *et al.*, 2004). En negrita se resaltan aquellos residuos interfásicos seleccionados para el presente estudio de la relación estructura-rigidez mecánica de MVM. (bp) indica que el residuo se encuentra localizado en la base de los poros de la cápsida; el análisis mecánico de estos residuos ya fue realizado en nuestro grupo (Castellanos *et al.*, 2012a). ^b Grado de conservación de cada residuo entre 7 parvovirus relacionados (Chapman y Rossmann, 1993). * indica que si bien no está conservado el residuo, si lo está la polaridad y tamaño aproximado de la cadena lateral. ^c Infectividad relativa con respecto al virión no mutado (infectividad relativa = 1).

Tabla 8. Interacciones de la cadena lateral (más allá del C β) de cada residuo interfásico con residuos situados en otro trímero (Intertrímeros), en la misma subunidad (IntraVP2) o en una subunidad vecina dentro del mismo trímero (VP2-VP2).

Mutante	Grupo ^a	Intertrímeros			VP2-VP2 ^c			IntraVP2		
		Puentes de Hidrógeno	van der Waals ^b	iónicos	Puentes de Hidrógeno	van der Waals ^b	iónicos	Puentes de Hidrógeno	van der Waals ^b	iónicos
K241	R	-	-	D553	-	-	-	-	1	R349
F55	R	-	12(10)	-	-	-	-	-	2	-
I84	R	-	1	-	-	5(4)	-	-	-	-
R83	R	2 P566	2	-	-	-	-	1 E105	11(6)	-
I207	R	-	1	-	-	-	-	-	-	-
N74	E	1 D507	2	-	-	-	-	-	1	-
H72	E	1 T506	8(5)	-	-	-	-	1 N74	3(1)	-
S550	E	2 Q548	8	-	-	-	-	-	-	-
K204	E	1 N80 1E79	E79	1	-	-	-	-	3(3)	-
D507	E	K166	3(1)	K166	-	-	-	-	-	-
I167	E	-	1	-	-	-	-	-	-	-
N554	E	-	10(4)	-	-	-	-	1 S560	1	-
S43	BP	1 L258	2	-	-	-	-	-	-	-
N149	BP	2 R260	4(1)	-	-	-	-	-	-	-
N170	BP	1 D171	5	-	-	-	-	-	-	-
D263	BP	1 S43	3	-	-	-	-	-	-	-
V40	BP	-	4(2)	-	-	-	-	-	-	-

^a R: residuos cuya mutación a alanina rigidifica considerablemente la cápsida; E: residuos cuya mutación a alanina no rigidifica considerablemente la cápsida; BP: residuos situados en la la base de los poros. ^b Se indica el número total de contactos de van der Waals y entre parentesis el número de contactos C-C. ^c Contactos entre 2 VP2 de un mismo trímero.

Los 12 mutantes interfásicos analizados aquí (10 de ellos por el autor de esta memoria y los 2 restantes por las Dras. Castellanos y Pérez de nuestro grupo) incluyen sustituciones individuales a alanina por las que se eliminan (por subunidad) un número variable de interacciones de van der Waals, y además uno o dos puentes de hidrógeno, una interacción iónica y/o interacciones hidrofóbicas (estimadas mediante el número de contactos de van der Waals apolares (C-C)) (Tabla 8). Este muestreo nos ha permitido estudiar la influencia de cada residuo, posición y tipo de interacciones que establece, sobre la rigidez mecánica de la cápsida de MVM.

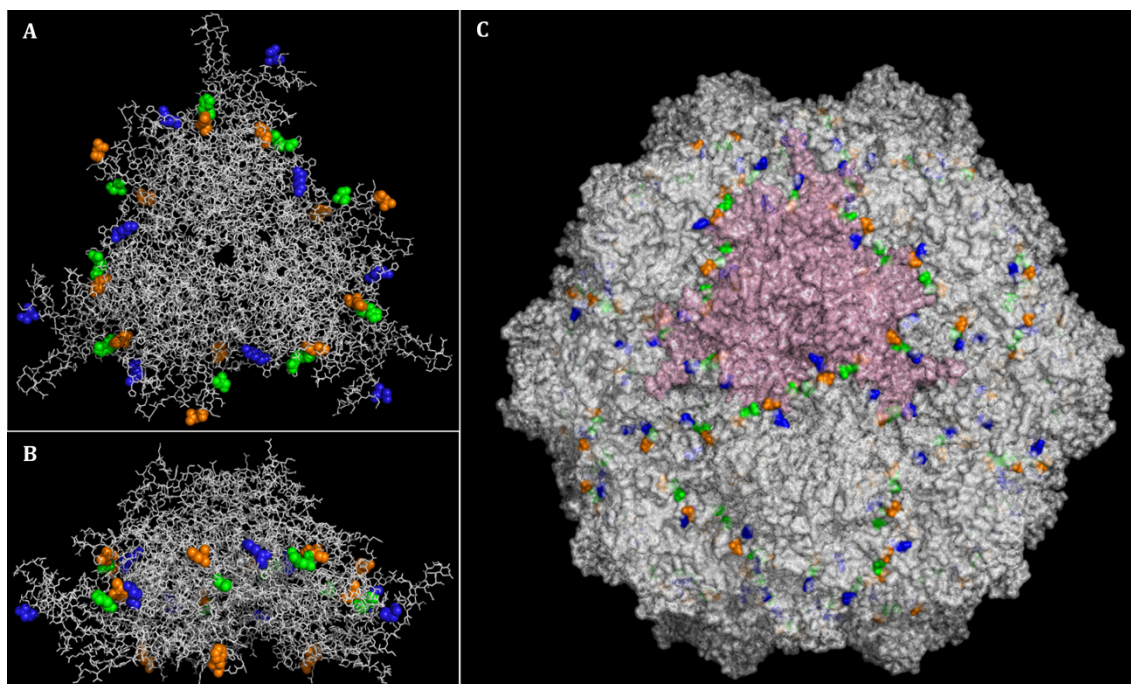


Figura 27. Localización en la estructura de MVM de residuos en las interfases intertriméricas cuyo papel sobre la rigidez mecánica se ha analizado en este estudio. A) trímero visto de frente; **B)** trímero visto de perfil; **C)** cápsida completa, en la que uno de los trímeros se resalta en color rosa. En los tres paneles, los residuos analizados se representan en un código de colores según el tipo de interacciones intertriméricas principales que establecen: verde, puentes de hidrógeno; azul interacciones iónicas; naranja, interacciones hidrofóbicas.

4.4.2. Efecto de la eliminación de cadenas laterales e interacciones intersubunidad sobre la rigidez mecánica de la cápsida de MVM

Se produjeron y purificaron las 12 cápsidas mutantes como se ha descrito (apartados 3.3 y 3.4.3). Sus constantes elásticas k_s para las regiones S2, S3 y S5, se determinaron en experimentos de indentación mediante AFM (apartado 3.13.5), utilizando la cápsida no mutada como control. La orientación de la partícula se determinó antes y después de las indentaciones mediante la toma de imágenes a alta resolución (Figura 3).

En las Figuras 28 y 29 se muestran gráficamente los resultados obtenidos con los 10 mutantes analizados por el autor. En cada caso, se compara el histograma obtenido para los valores de k_s para una región de la cápsida de un mutante con el histograma correspondiente a la cápsida control. Para cada mutante y el control, los resultados obtenidos para el valor de k_s del total de indentaciones sobre todas las partículas, se promediaron para cada región sondeada (S2, S3, S5). Los resultados numéricos completos

con los 12 mutantes se indican en la Tabla 9, incluyendo los valores medios de k_s , y los parámetros estadísticos en cada caso.

En primer lugar, observamos que casi todas las mutaciones (10 de 12) preservan la elasticidad de las regiones S5, o (para S550A, K241A, F55A y I167A), la reducen ligera o moderadamente (11%-26%). En solo dos casos (D507A, cerca de la base de los poros, y R83A) se apreció un ligero o moderado incremento de rigidez en S5 (15% y 34%, respectivamente). Sumando los resultados obtenidos con estas 12 cápsidas mutantes con los obtenidos previamente con otras cápsidas mutadas (en cavidades o en la base de los poros), podemos concluir que todas excepto una (R83A) de las mutaciones analizadas que rigidifican las regiones S5 se encuentran sustancialmente cerca de los ejes S5. El residuo R83 no se encuentra cerca de los poros, pero el efecto de su mutación es enteramente consistente con el perfecto ligamiento que encontramos entre elasticidad mecánica, dinámica de la región del poro e infectividad de MVM (Castellanos *et al.*, 2012a), ya que la mutación R83A, además de rigidificar la región S5 de la cápsida, reduce drásticamente la infectividad del virión (Tabla 7).

A diferencia de lo observado para las regiones S5, y de modo muy llamativo, encontramos que casi todas las mutaciones interfásicas analizadas en este estudio (10 de 12) aumentan, en general muy notablemente, la rigidez mecánica de la cápsida en las regiones S2 y S3 y, por tanto, también la rigidez mecánica global de la cápsida. En algunos mutantes la rigidez mecánica local llega a duplicarse (región S3 en el mutante I207A). Las únicas excepciones son S550A y N74A, que mantienen la rigidez de S2 o S3 o la reducen muy ligeramente (máximo 17%). Este incremento generalizado de la rigidez resulta contraintuitivo: todas las mutaciones realizadas eliminan grupos atómicos (dejando, en principio, oquedades en su lugar) e interacciones entre trímeros, incluyendo en muchos casos interacciones direccionales (puentes de hidrógeno); además, aunque los ejes S2 se ubican sobre las interfases intertrímeros, muchas de estas mutaciones se encuentran relativamente lejos de estos ejes; y todas ellas se localizan muy lejos de los ejes S3, que se sitúan en los centros de los trímeros (comparar Tablas 8 y 9).

Mutaciones que eliminan interacciones polares

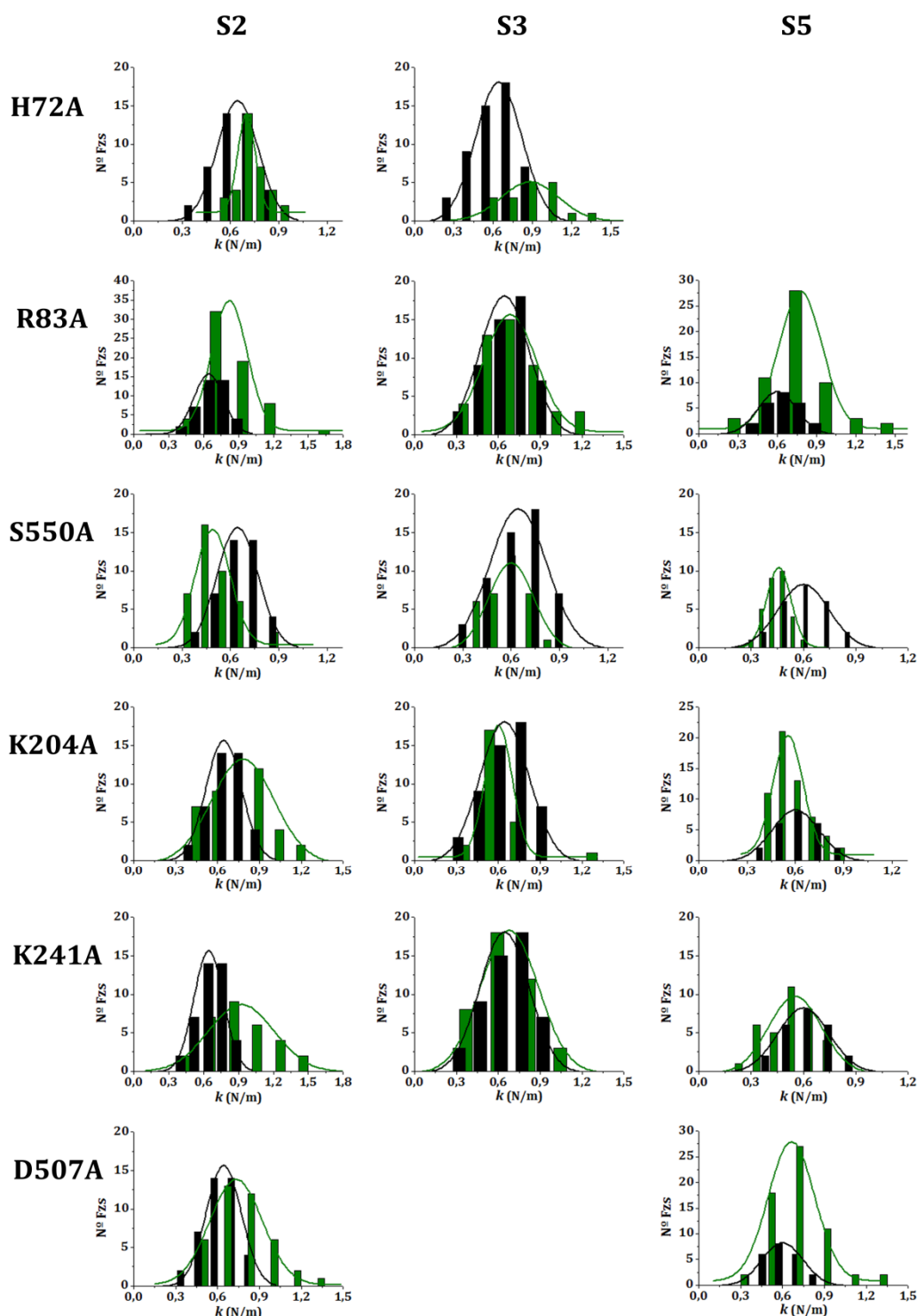


Figura 28. Comparación de la rigidez mecánica de cápsidas de MVM con mutaciones que eliminan interacciones polares intertriméricas. En cada fila, cada histograma representa la distribución del valor de k_s obtenido para el control no mutado (wt, en negro) y el mutante indicado a la izquierda de la fila (en verde), para las regiones de la cápsida S2 (izquierda), S3 (centro) y S5 (derecha). Para los mutantes H72A (región S5) y D507A (región S3) no se representan los histogramas por el menor número de valores de k_s obtenidos. Estos datos se están completando actualmente.

Mutaciones que eliminan interacciones apolares

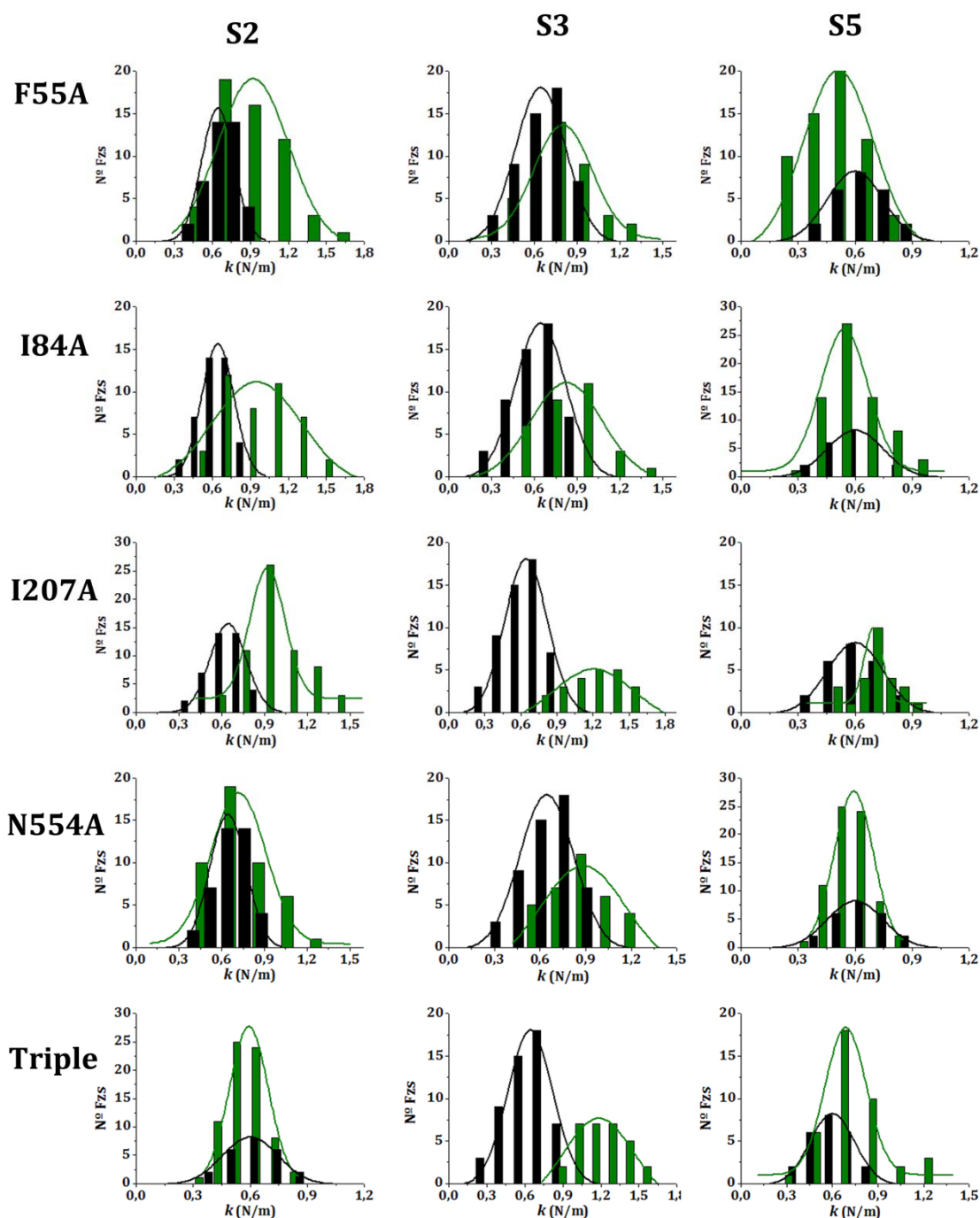


Figura 29. Comparación de la rigidez mecánica de cápsidas de MVM con mutaciones que eliminan interacciones polares intertriméricas. En cada fila, cada histograma representa la distribución del valor de k_s obtenido para el control no mutado (wt, en negro) y el mutante indicado a la izquierda de la fila (en verde), para las regiones de la cápsida S2 (izquierda), S3 (centro) y S5 (derecha). “Triple” se refiere al triple mutante I84A/I207A/N554A.

Tabla 9. Efectos de las mutaciones analizadas sobre la rigidez mecánica del virión de MVM en regiones S2, S3 y S5.

	S2				S3				S5			
	k_s (N/m) ^a	Fz ^b	n ^c	t ^d	k_s (N/m) ^a	Fz ^b	n ^c	t ^d	k_s (N/m) ^a	Fz ^b	n ^c	t ^d
wt	0,63 ± 0,12	41	7		0,62 ± 0,16	53	11		0,61 ± 0,12	24	4	
R83A	0,87 ± 0,19	64	7	4,1x10 ⁻¹¹	0,73 ± 0,20	47	6	2,3x10 ⁻³	0,82 ± 0,23	57	6	7,4x10 ⁻⁵
H72A	0,73 ± 0,12	35	5	5,8x10 ⁻⁴	0,89 ± 0,22	18	4	4,2x10 ⁻⁷	0,64 ± 0,18	28	4	0,368
N74A*	0,52 ± 0,11	57	10	0,09	0,59 ± 0,17	55	9	0,07	0,57 ± 0,15	62	7	0,34
S550A	0,53 ± 0,12	41	7	1,8x10 ⁻⁴	0,58 ± 0,12	34	4	0,251	0,45 ± 0,07	30	3	1,9x10 ⁻⁷
R83A S550A	No ensambla											
R83A H72A S550A	No ensambla											
K204A	0,79 ± 0,21	47	5	2,0x10 ⁻⁵	0,64 ± 0,18	26	5	0,698	0,60 ± 0,11	58	5	0,821
D507A	0,78 ± 0,20	40	6	1,2x10 ⁻⁴	0,80 ± 0,23	21	4	2,9x10 ⁻⁴	0,70 ± 0,19	62	4	0,018
K241A	0,97 ± 0,30	30	4	9,5x10 ⁻¹⁰	0,65 ± 0,19	36	5	0,361	0,54 ± 0,14	35	4	0,052
F55A	0,95 ± 0,24	55	6	1,9x10 ⁻¹¹	0,82 ± 0,21	43	6	5,9x10 ⁻⁷	0,51 ± 0,15	61	5	0,010
I84A	0,96 ± 0,27	43	7	2,4x10 ⁻¹⁰	0,84 ± 0,22	30	5	6,6x10 ⁻⁷	0,58 ± 0,15	67	5	0,540
I167A*	0,67 ± 0,18	62	6	3,0x10 ⁻⁵	0,92 ± 0,28	143	17	5x10 ⁻³²	0,53 ± 0,15	49	7	0,01
I207A	0,94 ± 0,19	62	7	4,3x10 ⁻¹⁶	1,20 ± 0,22	21	5	1,3x10 ⁻¹⁹	0,68 ± 0,11	26	4	0,017
N554A	0,77 ± 0,20	46	5	1,8x10 ⁻⁴	0,89 ± 0,19	33	3	3,2x10 ⁻¹⁰	0,59 ± 0,10	71	3	0,649
I84A I207A N554A	1,05 ± 0,20	38	5	2,3x10 ⁻¹⁸	1,19 ± 0,18	30	3	8,51x10 ⁻²⁵	0,72 ± 0,22	40	3	0,016

^a Constante elástica promedio y desviación estándar; ^b número total de indentaciones realizado sobre partículas con la misma mutación en la misma región; ^c número total de partículas analizado para una misma mutación y región; ^d resultado del análisis estadístico t-student con un nivel de confianza del 95%.

A continuación compararemos el efecto de diferentes mutaciones en las interfases entre trímeros sobre la rigidez mecánica local y global en función de diferentes variables estructurales y funcionales:

1- Tipo de interacción: La Tabla 10 resume el efecto sobre la rigidez mecánica de la cápsida de las 17 mutaciones analizadas que afectan residuos en las interfases intertriméricas (incluyendo las de residuos situados en la base de los poros (Castellanos *et al.*, 2012a), que hemos clasificado según el tipo de interacciones eliminadas.

Mutaciones que eliminan enlaces de hidrógeno. Las 10 mutaciones que eliminan puentes de hidrógeno (comparar Tablas 8 y 10) provocaron variaciones de rigidez (k_s) de -17% a +59% en el eje S2 (promedio +21%), y de -6% a +87% en el eje S3 (promedio +32%). En alguno de estos casos, además de puentes de hidrógeno se eliminaron un enlace iónico o algunos contactos C-C; pero cuando descartamos estos casos estructuralmente más complejos, el resultado fue similar (promedios +20% para S2 y +32% para S3).

Mutaciones que eliminan enlaces iónicos. La mutación K241A, que solo eliminó un enlace iónico, produjo incrementos de rigidez de +54% para S2 y +5% para S3; las dos mutaciones que además eliminan puentes de hidrógenos produjeron, en promedio, incrementos de +25% y +16%.

Mutaciones que eliminan interacciones hidrofóbicas. Las 4 mutaciones que eliminan un cierto número de contactos C-C pero no enlaces de hidrógeno o iónicos (comparar Tablas 8 y 10) produjeron incrementos de +22% a +51% en S2 (promedio +37%) y de +32% a +108% en S3 (promedio 70%). Por tanto, la rigidificación al eliminar contactos hidrófobos resultó en promedio notablemente mayor que cuando se eliminan enlaces de hidrógeno o iónicos. Sin embargo, dos de las tres mutaciones que produjeron mayor rigidificación fueron precisamente las que menos contactos C-C (y otros contactos de van der Waals) eliminaron.

Mutaciones que eliminan únicamente un número mínimo de interacciones de van der Waals entre trímeros. En los dos casos analizados, los incrementos de rigidez (I84A: 52% para S2 y 35% para S3; I167A, 6% en S2 y 48% en S3) fueron comparables a los de otras mutaciones que eliminaban interacciones intertrímeros más energéticas y mucho más numerosas.

Tabla 10. k_s de cápsidas mutantes en las que se eliminan cadenas laterales implicadas en interacciones entre trímeros.

	Grupo ^a	k_s (N/m) ^b		
		S2	S3	S5
wt		0,63 ± 0,12	0,62 ± 0,16	0,61 ± 0,12
S43A	I	0,89 ± 0,31	0,99 ± 0,36	0,83 ± 0,23
N74A	I	0,52 ± 0,11	0,59 ± 0,17	0,57 ± 0,15
R83A	I	0,87 ± 0,19	0,73 ± 0,20	0,82 ± 0,23
H72A	I	0,73 ± 0,12	0,89 ± 0,22	0,64 ± 0,18
N149A	I	0,85 ± 0,21	0,93 ± 0,25	0,93 ± 0,24
N170A	I	1,00 ± 0,48	0,88 ± 0,35	0,98 ± 0,21
D263A	I	0,67 ± 0,17	1,16 ± 0,35	0,87 ± 0,27
S550A	I	0,53 ± 0,12	0,58 ± 0,12	0,45 ± 0,07
K204A	I/II	0,79 ± 0,21	0,64 ± 0,18	0,60 ± 0,11
D507A	I/II	0,78 ± 0,20	0,80 ± 0,23	0,70 ± 0,19
K241A	II	0,97 ± 0,30	0,65 ± 0,19	0,54 ± 0,14
V40A	III	0,78 ± 0,33	1,29 ± 0,39	0,81 ± 0,23
F55A	III	0,95 ± 0,24	0,82 ± 0,21	0,51 ± 0,15
I207A	III	0,94 ± 0,19	1,20 ± 0,22	0,68 ± 0,11
N554A	III	0,77 ± 0,20	0,89 ± 0,19	0,59 ± 0,10
I84A	IV	0,96 ± 0,27	0,84 ± 0,22	0,58 ± 0,15
I167A	IV	0,67 ± 0,18	0,92 ± 0,28	0,53 ± 0,15
I84A I207A N554A		1,05 ± 0,20	1,19 ± 0,18	0,72 ± 0,22

^a El número indica el tipo de interacción principal eliminada (ver Tabla 8): grupo I, puentes de hidrógeno; grupo II, interacciones iónicas; grupo III, interacciones hidrofóbicas; grupo IV, únicamente un número mínimo de interacciones de van der Waals. ^b Valor medio de la k_s y desviación estándar para las regiones S2, S3 y S5.

En resumen, el incremento de rigidez, tanto en S2 como en S3, parece ocurrir de modo fundamentalmente independiente del tipo y número de interacciones interfásicas eliminadas, y de la presumible energía de asociación entre trímeros perdida a causa de la mutación.

2- Localización de la mutación en la interfase intertrimérica: El resultado anterior nos llevó a agrupar empíricamente las mutaciones en dos clases, según su efecto sobre la rigidez mecánica de las regiones S2, que son las que se encuentran centradas en las interfases entre cada par de trímeros (Figura 7): grupo R, mutaciones (R83A, K241A, F55A, I84A e I207A) que resultan en mayores incrementos de rigidez (k_s = 0,9-1,0 N/m); y grupo E, mutaciones (H72A, H74A, S550A, K204A, D507A, I167A Y N554A) que no incrementan la rigidez o lo hacen moderadamente (k_s = 0.5-0.8 N/m). Las posiciones de las

mutaciones de ambos grupos sobre un trímero de subunidades y sobre una proteína subunidad (VP2) se indican en la Figura 30. El resultado mostró una clara diferencia en la localización de las mutaciones de ambos grupos. Las 5 mutaciones del grupo R con un claro efecto sobre la rigidez de S2 (incremento promedio +49%) mapearon a lo largo de las líneas principales de las interfases entre trímeros. Estas mutaciones afectan residuos que se encuentran en elementos de la estructura secundaria de VP2 o, en un caso, un residuo en la pared interna de la cápsida. Además, entre estos residuos son más frecuentes las cadenas laterales hidrofóbicas o con un fuerte componente hidrofóbico. Por el contrario, las 7 mutaciones del grupo E que tuvieron poco o ningún efecto sobre la rigidez de S2 (incremento promedio +8%) se localizan en bucles expuestos en la superficie externa de la cápsida. Estos bucles no están estrechamente asociados con el resto de la subunidad a la que pertenecen, sino que se extienden sobre subunidades vecinas con las que presentan cierta conexión superficial. Además, todos los residuos del grupo E excepto I167 presentan esencialmente cadenas laterales polares y sustancialmente expuestas al solvente.

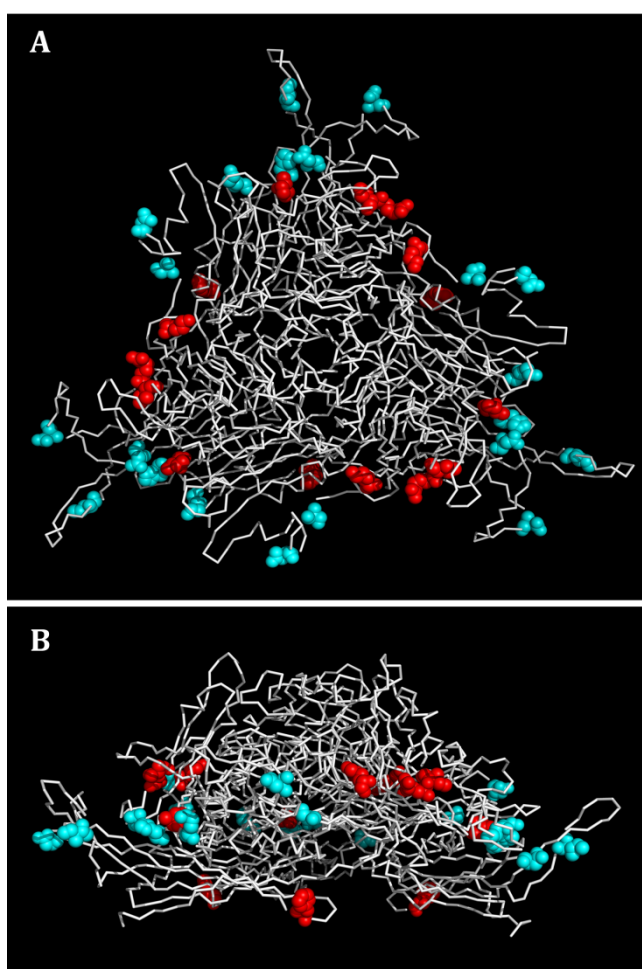


Figura 30. Localización en la estructura de MVM de residuos en las interfases intertriméricas pertenecientes a los grupos R y E.

A) trímero visto de frente; **B)** trímero visto de perfil. Los residuos del grupo R (R83, K241, F55, I84 e I207) (en rojo) son aquellos cuya mutación a alanina rigidifica considerablemente la región S2. Los residuos del grupo E (H72, H74, S550, K204, D507, I167 Y N554) (en cyan) son aquellos cuya mutación a alanina no rigidifica considerablemente la región S2.

Los residuos del grupo R, considerados conjuntamente, también rigidifican las regiones S3 más que los residuos del grupo E (37% frente a 21%), pero en este caso la diferencia entre grupos es mucho menos dramática. Un punto a considerar para explicar estas diferencias de rigidificación según la posición y el eje considerados es que los residuos del grupo R en cada trímero se encuentran todos muy alejados de los ejes S3, que están situados en el centro de cada trímero, mientras que los residuos del grupo E en cada trímero están más cerca de los ejes S3 (de los trímeros vecinos) (comparar Figuras 7 y 30).

3- Infectividad. Por razones técnicas no se pudieron introducir tres de estas 12 mutaciones en el clon infeccioso de MVM. De los 9 viriones mutantes producidos, 6 fueron significativamente menos infecciosos que el parental (títulos entre un 10% y menos de 0.001% con respecto al título del virión no mutado en experimentos controlados internamente)(Reguera *et al.*, 2004). Cuando se analizaron mutantes individuales no se observó una correlación entre grado de rigidificación de la cápsida y grado de reducción de infectividad. Sin embargo, el 80% de los viriones del grupo R, frente a solo el 50% de los viriones del grupo E, mostraron una infectividad reducida, sugiriendo globalmente una conexión laxa entre rigidificación y pérdida de infectividad (ver Discusión).

En resumen, mutaciones muy diferentes que eliminan grupos e interacciones diversas en diferentes posiciones a lo largo de las interfases entre trímeros, de modo general, transforman la cápsida de MVM, que es relativamente elástica y mecánicamente isótropa, en una cápsida mecánicamente anisótropa que presenta una rigidez notablemente aumentada en las regiones S2 y S3. Estos resultados sugieren que muchos residuos interfásicos en el cinturón principal de las interfases entre trímeros en la cápsida de MVM mantienen a ésta cerca de un máximo de elasticidad. Este efecto parece mediado por la presencia de cadenas laterales de cierto volumen, y no por el tipo de cadena lateral, o por las interacciones que ésta establece con residuos del trímero vecino o de su mismo trímero.

4.4.3. Efectos de la combinación de mutaciones en interfases entre subunidades sobre la rigidez mecánica de la cápsida de MVM

Investigamos por último si la combinación de mutaciones relativamente alejadas unas de otras en las interfases intertriméricas producían variaciones aditivas de rigidez mecánica. Se construyeron tres mutantes múltiples (Tabla 9). Dos de las tres combinaciones de mutaciones ensayadas (R83A/S550A y R83A/H72A/S550A) impidieron el ensamblaje de la cápsida. La combinación restante (I84A/I207A/N554A) permitió el

ensamblaje de la cápsida, cuya rigidez mecánica local y global fue determinada del mismo modo que para los mutantes sencillos. La triple mutación no afectó a la rigidez local de las regiones S5, como se esperaba de la localización de las mutaciones. Sin embargo, la cápsida con la triple mutación resultó ser una de las más rígidas analizadas, tanto localmente en las regiones S2 y S3 (1,05 N/m y 1,19 N/m respectivamente), como globalmente (Tabla 9). A pesar de ello, el efecto combinado de las tres mutaciones resultó claramente inferior al esperado si sus acciones mecánicas fueran aditivas.

DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1. Distribución de carga en la pared interna de la cápsida y dinámica conformacional en MVM

¿Cómo se neutralizan las cargas del ADN empaquetado en el virión de MVM?

Considerada globalmente, la pared interna de la cápsida de MVM es eléctricamente casi neutra. Además, con excepciones destacables que se discuten más adelante, la mayoría de grupos con carga de signos contrarios se encuentran cerca unos de otros, con lo que deben neutralizar mutuamente sus cargas. Aunque el Nt de VP1 presenta un exceso de carga positiva (Tabla 2), no es necesario para la formación de viriones que contienen el genoma íntegro (Tullis *et al.*, 1993), lo que sugiere que no participa de modo funcionalmente relevante en la neutralización de cargas negativas del ADN empaquetado. La importancia biológica del Nt de VP1 se debe a que contiene diferentes elementos funcionales, incluyendo un motivo de localización nuclear (Lombardo *et al.*, 2002; Valle *et al.*, 2006). El Nt de VP2 presenta cierto exceso de carga negativa (Tabla 2). Los Nt parecen carecer de estructura definida y se encuentran poco conectados con el resto de la cápsida, por lo que existe la posibilidad de que el exceso de carga positiva de cada Nt de VP1 sea, en parte al menos, neutralizado por el exceso de carga negativa de varios Nt de VP2 vecinas. El procesamiento de VP2 a VP3 durante el ciclo viral elimina aproximadamente los primeros 25 residuos del Nt de VP2 pero no existe aumento de cargas no neutralizadas, ya que dicho fragmento eliminado contiene las mismas cargas positivas que negativas (3 de cada signo).

Esta neutralidad eléctrica general en la pared interna de la cápsida de MVM contrasta fuertemente con la de otros virus icosaédricos, en los que la cara interna presenta un gran exceso de cargas positivas (sobre negativas) que compensarían buena parte del gran número de cargas negativas del genoma viral (Tao Hu, 2008; VIPER, Carrillo-Tripp *et al.*, 2009).

No resulta fácil imaginar una situación en que las cargas negativas del ADN cs empaquetado en el virión de MVM (≈ 5500) no estén neutralizadas en su mayoría. El escaso volumen disponible en el interior de MVM implica que el ADN se encuentra fuertemente empaquetado. En el supuesto de que la maquinaria de empaquetamiento fuera capaz de vencer la repulsión mutua de semejante número de cargas, el ADN debería

ejercer una fuerte presión radial sobre la pared de la cápsida. Por tanto, sería de esperar que la rigidez mecánica del virión con el ADN empaquetado fuera mayor que la de la cápsida vacía. Sin embargo, la rigidez del virión conteniendo el ADN completo (pero con mutaciones que reducen las interacciones no covalentes cápsida-ADN) es similar a la de la cápsida vacía (Carrasco *et al.*, 2008).

Además, la adición de un gran exceso de polición espermidina aumentó la rigidez mecánica del fago $\phi 29$ (Hernando-Perez *et al.*, 2012) pero no la de MVM (M.Castellanos y M.G.Mateu, observaciones no publicadas). Las dimensiones de la molécula de espermidina le permitirían penetrar a través de los poros de la cápsida de MVM, neutralizando las cargas del ADN y reduciendo la presión interna si la hubiera y, por tanto, la rigidez mecánica. No obstante, este resultado preliminar deberá controlarse adecuadamente demostrando que la espermidina es realmente capaz de ser internalizada.

Asimismo, las interacciones nativas cápsida-ADN contribuyen notablemente a la estabilidad del virión de MVM frente a su inactivación térmica (apartado 5.3). Por el contrario, la introducción en el virión de un exceso de grupos cargados positivamente, algunos de ellos en posiciones muy cercanas a los segmentos de ADN unidos a la cápsida, no aumentó la estabilidad del virión frente a la inactivación, y en algún caso la disminuyó (mutaciones Q137K y Q255R y, en menor medida, T257K). Además, la eliminación de residuos cargados positivamente, excepto en un caso (R54A), no redujo la estabilidad del virión (apartado 4.1.3).

El conjunto de observaciones mencionadas sugiere que en el virión de MVM, las cargas del ADN empaquetado deben estar en gran medida neutralizadas por pequeños cationes. La desestabilización estructural que pudiera existir debido a la presencia de algunos fosfatos no neutralizados podría estar compensada por la reducción de energía libre debida a las interacciones (no iónicas) entre la cápsida y segmentos específicos de ADN (Figura 8).

Un papel biológico para un anillo de residuos cargados negativamente alrededor de cada poro de la cápsida de MVM

La introducción o eliminación individual de grupos básicos, excepto en el caso de S182H, no afectó a la infectividad del virión. Por el contrario, la eliminación de grupos ácidos evolutivamente conservados provocó pérdidas drásticas de infectividad en todos los casos, excepto en el caso de E472A, en que la reducción fue menor. Tres de estos residuos ácidos muy conservados (146, 263 y 264) (Tabla 3) forman un pequeño cúmulo en cada

subunidad, y definen un anillo formado por 5 de estos cúmulos, que rodea de cerca a cada poro de la cápsida (ejes S5) (Figura 11). Los resultados (apartado 4.1.4) indican que estos anillos de residuos cargados negativamente son funcionalmente críticos para el mantenimiento de la dinámica conformacional de la cápsida alrededor de los poros (transición estructural asociada a la externalización de Nt de VP2) y, por ello, para la infectividad del virión. Nuestro análisis mutacional detallado indica que el mantenimiento de infectividad no solo requiere la presencia de cadenas laterales de cierto volumen en estas posiciones, sino que además es necesario mantener un exceso de carga negativa no neutralizada en estos anillos, localizada en 10 residuos (263 y 264) de cada anillo.

Desconocemos de momento la razón estructural por la que estos anillos de potencial electrostático negativo alrededor de los poros son necesarios para que ocurra la transición estructural asociada a los mismos. Sin embargo, podemos apuntar tentativamente algunas posibilidades: i) Los grupos ácidos en estos anillos podrían constituir un “interruptor molecular”: a pH normal retendrían por atracción electrostática los extremos Nt de VP1 para que no se externalicen antes de tiempo inhibiendo la infectividad (Farr y Tattersall, 2004; Farr *et al.*, 2006; Cotmore y Tattersall, 2007); a pH ácido (en los endosomas) los carboxilatos del anillo se protonarían y los Nt de VP1 se liberarían. Esta posibilidad es consistente con la necesidad de una disminución del pH para que se externalice el Nt de VP1 durante la infección (Mani *et al.*, 2006). ii) las repulsiones generadas entre los grupos ácidos en determinadas circunstancias podrían facilitar el reordenamiento de la zona alrededor de cada poro (Speir *et al.*, 1995; Konecny *et al.*, 2006). iii) estas repulsiones podrían reducir el empaquetamiento local y aumentar la flexibilidad conformacional (Vallone y Brunori, 2004).

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio indican que la pared interna de la cápsida de MVM es (globalmente) electrostáticamente neutra; que la presencia y distribución en ella de residuos positivamente cargados no contribuye en general al ensamblaje de la cápsida, ni a la neutralización de las cargas del ADN viral, ni a la estabilización del virión frente a la inactivación térmica; que el ADN genómico en el interior del virión debe estar neutralizado principalmente por pequeños cationes; y que anillos de residuos cargados negativamente y situados alrededor de los poros son críticos para el mantenimiento de la dinámica conformacional de los mismos y la infectividad del virión.

5.2. Intermediarios en la ruta de (des)ensamblaje de MVM

Durante el ciclo viral, una cápsida o virión está sometido a fuerzas mecánicas en diferentes situaciones, como colisiones con otras moléculas, movimiento rápido en fluidos viscosos con una elevada concentración de macromoléculas (fuerzas de cizallamiento), extrusión a través de poros y canales, cambios de presión osmótica, presión hidrostática, desecación (fuerzas capilares, (Carrasco *et al.*, 2009)), etc. Sin embargo, la fuerza aplicada en nuestros experimentos de desensamblaje mecánico no pretende mimetizar las fuerzas mecánicas a las que está sometido un virus en condiciones fisiológicas. El objetivo es comunicar a las partículas víricas, por un medio mecánico y en condiciones que permiten visualizar los fragmentos desensamblados, la energía que, en condiciones fisiológicas, se aporta de otras maneras: por ejemplo, en el caso del virus de la fiebre aftosa, mediante protonación de ciertos residuos de la cápsida en el endosoma (Ellard *et al.*, 1999) o, en poliovirus, mediante unión al receptor celular (Chow *et al.*, 1997). Tradicionalmente se ha venido estudiando el desensamblaje de virus mediante calentamiento o utilizando urea o cloruro de guanidinio, que tampoco están normalmente presentes durante el proceso fisiológico de infección, pero que igualmente comunican la energía suficiente para disparar el proceso.

La desencapsidación del genoma de MVM en el núcleo de la célula infectada parece no implicar un desensamblaje de la cápsida, sino la eyección del ADN a través de los poros de la misma (Plevka *et al.*, 2011). Por tanto, desde el punto de vista biológico el mayor interés de los estudios de desensamblaje de la cápsida de MVM es que este proceso puede recapitular, en sentido inverso, la ruta de autoensamblaje, que es desconocida. La evidencia disponible es consistente con la idea de que el ensamblaje de la cápsida de MVM (antes del empaquetamiento del DNA; Almendral, 2013; Cotmore y Tattersall, 2014) es un proceso reversible, aunque el desensamblaje está desfavorecido por histéresis (Singh y Zlotnick, 2003; Castellanos *et al.*, 2012b).

En nuestros experimentos de desensamblaje mecánico (apartado 4.2.1; Castellanos *et al.*, 2012b) hemos comprobado experimentalmente la existencia de intermediarios de (des)ensamblaje predichos en diferentes estudios teóricos (ver apartado 1.1.2), que se discuten a continuación.

i) *Cápsidas a las que les falta un único trímero.* La frecuente observación de estas partículas sugiere que la primera etapa en el desensamblaje de MVM es la liberación de un

trímero; y que la última fase en el ensamblaje reversible de la cápsida sería su cerramiento mediante adición de un último trímero, como se ha predicho mediante simulaciones MD de un virus icosaédrico T=1 (Rapaport, 2008 y 2010). No toda la energía disipada en el proceso de liberación mecánica de un trímero de la cápsida de MVM tiene por qué corresponder a este proceso. No obstante, el valor calculado es del mismo orden que el estimado para la interacción subunidades de otras cápsidas icosaédricas sencillas, como las de HBV o CCMV (Katen y Zlotnick, 2009), y el obtenido para la energía de asociación mediante estimaciones simplificadas basadas en área enterrada durante la asociación (Carrillo-Tripp et al., 2009). La liberación frecuente de trímeros, y no dímeros o pentámeros de subunidades, es consistente con la mucha mayor debilidad energética de las interfases intertriméricas frente a las intratriméricas (Carrillo-Tripp et al., 2009).

La existencia de histéresis durante el desensamblaje en solución de cápsidas de virus icosaédricos ha sido justificada teóricamente (Singh y Zlotnick, 2003; Reguera, 2013). Esta situación constituye una trampa cinética que evita la disociación de partículas víricas termodinámicamente inestables, contribuyendo al mantenimiento de la integridad del virión incluso a concentraciones muy bajas del mismo (como ocurre en el medio extracelular). Por tanto, ¿por qué en los experimentos de desensamblaje mecánico observamos con frecuencia cápsidas de MVM a las que falta un trímero y que se mantienen de forma estable sin disociarse, pero también sin captar rápidamente el trímero que les falta? La razón es, probablemente, que en los experimentos de AFM de "molécula única", las partículas víricas se hallan muy dispersas e inmovilizadas, solo una de ellas es sometida a desensamblaje, y el único trímero disociado de esa única partícula se diluye infinitamente en el medio líquido, o incluso se adsorbe rápidamente al sustrato, lo que ayuda a "congelar" (estabilizar relativamente) y por tanto observar estas cápsidas casi completas que, en una suspensión de cápsidas sometidas a desensamblaje (o ensamblaje), no se encuentran pobladas en el equilibrio.

ii) *Cápsidas a las que le faltan dos trímeros.* En algunas ocasiones observamos que la pérdida de un trímero fue seguida de la pérdida de un segundo trímero. Estas observaciones apoyan experimentalmente las predicciones de modelos teóricos en los que, al menos durante las etapas iniciales de desensamblaje, o finales de ensamblaje, los capsómeros se disociarían o asociarían de forma secuencial en un proceso de acreción.

iii) *Cápsidas a las que le falta un pentámero de trímeros.* La pérdida de un pentámero de trímeros ocurrió con una frecuencia aproximadamente tres veces menor que la de un solo trímero, dejando cápsidas incompletas "tres cuartos" (45 subunidades de las 60)

relativamente inestables, que se disociaban fácilmente en fragmentos menores. Estas observaciones apoyan las predicciones teóricas realizadas a partir de cálculos de energía de asociación (Reddy *et al.*, 1998) de parvovirus como MVM, que sugerían la existencia de este tipo de partículas como intermediarios transitorios dominantes en el proceso de ensamblaje/desensamblaje.

iv) Pentámeros de trímeros. Con relativa frecuencia se observaron pentámeros de trímeros (a veces más de uno) que presentaban notable estabilidad. Éstos aparecían bien aislados o bien al lado de cápsidas "tres cuartos" a las que faltaba un pentámero de trímeros. De nuevo, estas observaciones son consistentes con las simulaciones MD (Rapaport, 2008 y 2010) que predijeron la existencia transitoria de pentámeros de capsómeros durante el ensamblaje de cápsidas icosaédricas T=1 como la de MVM. Estos intermediarios, bien provenientes de la asociación de capsómeros por acreción, o de la disociación parcial de una cápsida en etapas finales de ensamblaje (o iniciales de desensamblaje), tenían una vida media predicha mayor que otros intermediarios de menor tamaño. La liberación relativamente frecuente de pentámeros de trímeros parece ocurrir a mayores energías en indentaciones más profundas que en los casos en que se liberan trímeros. Esto es consistente con la necesidad de romper 5 interfases intertriméricas en lugar de solo tres. No observamos dímeros de trímeros o trímeros de trímeros, y estos tampoco fueron predichos como intermediarios transitorios mayoritarios en las mencionadas simulaciones MD (Rapaport, 2008 y 2010).

En conclusión, en vista de las predicciones sobre intermediarios de ensamblaje de virus icosaédricos muy sencillos como MVM, y su confirmación experimental en este estudio, proponemos tentativamente el siguiente modelo de (des)ensamblaje reversible para la cápsida de MVM (Figura 31)(Castellanos *et al.*, 2012b). Los trímeros de subunidades constituyen los elementos estables (bloques de construcción) para el ensamblaje; muchos de ellos se asociarían en pentámeros de trímeros, los cuales podrían constituir los núcleos de un proceso de ensamblaje por nucleación. Sobre los pentámeros de trímeros se asociarían más trímeros mediante acreción, formando cápsidas incompletas, entre las que cápsidas "tres cuartos" serían prevalentes, llegando a formarse cápsidas casi enteras a las que falta un trímero que, tras asociar el último trímero, dan lugar a cápsidas completas. El desensamblaje estaría muy desfavorecido por histéresis. De superarse esta barrera cinética, la cápsida se desensamblaría a través de la ruta inversa a la seguida durante el ensamblaje.

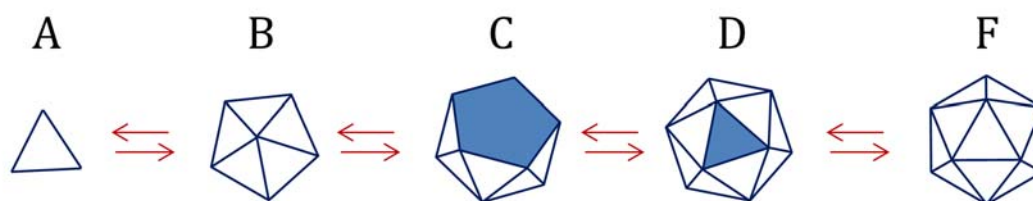


Figura 31. Modelo propuesto para la ruta de ensamblaje de MVM. En el texto (ver arriba) se explica el modelo en detalle. Brevemente: Trímeros estables de VPs (**A**) se asocian mayoritariamente en pentámeros de capsómeros (**B**), posibles núcleos de ensamblaje. Sobre éstos se unen nuevos trímeros dando lugar a cápsidas cada vez más completas, entre las cuales dominarían aquellas carentes de un pentámero de trímeros (**C**) o de un único trímero (**D**). La captación de un último trímero formaría la cápsida completa (**F**).

5.3. Determinantes moleculares de propiedades mecánicas de MVM, e implicaciones biológicas

En este trabajo de Tesis Doctoral se han realizado dos estudios en los que se han investigado con detalle diferentes determinantes moleculares de la rigidez o elasticidad mecánica de partículas víricas, utilizando MVM como modelo. El primer estudio (apartado 4.3; Castellanos *et al.*, 2015) ha permitido completar un trabajo de nuestro grupo sobre el papel de residuos situados en interfases cápsida-ADN en la mecánica de MVM. Este estudio ha permitido, además, descubrir una relación cuantitativa entre rigidez mecánica local de un virión y propensión a sufrir una transición estructural. Por último, ha revelado un papel biológico de una propiedad mecánica del virión de MVM: la rigidificación local de la partícula, mediada por interacciones cápsida-ADN, confiere una ventaja selectiva porque dificulta una transición inducida por calor que inactiva el virión, sin impedir otros cambios conformacionales de la partícula que son necesarios para la infectividad. El segundo estudio (apartado 4.4) ha explorado en detalle, por primera vez, el papel en la rigidez mecánica de una partícula vírica de residuos situados a lo largo de interfases entre subunidades de la cápsida, y de las interacciones intersubunidad que estos residuos establecen.

Interfases ADN-proteína y rigidez mecánica de MVM

Nuestra hipótesis de una relación entre un aumento de rigidez mecánica en una región de una partícula vírica y una disminución de la propensión a realizar un cambio estructural en el que esa región está implicada viene apoyada por dos estudios de nuestro grupo sobre diferentes características de MVM: i) un aumento de rigidez en las regiones

S5 de la cápsida producido por mutaciones en la base de los poros en los ejes S5 (Figura 26) está íntimamente asociada con un cambio conformacional que se requiere para que el virus sea infectivo (Castellanos *et al.*, 2012a). En el presente trabajo, el análisis mecánico de diferentes mutantes adicionales a los anteriormente utilizados ha contribuido a reforzar aún más la validez de esta hipótesis. ii) la reducción de rigidez mecánica de las regiones S2/S3 por mutaciones que eliminan interacciones cápsida-ADN (Figura 32, residuos en color verde) está invariablemente asociada con una mayor propensión del virión a sufrir un cambio conformacional que produce la inactivación de su infectividad, como demostramos en esta Tesis (apartado 4.3.2).

De modo particularmente interesante, el presente estudio ha revelado una relación cuantitativa exponencial entre un incremento en la constante elástica (k_s) de las regiones S2/S3 implicadas en contactos cápsida-ADN y una reducción en la constante de inactivación térmica del virión (k_{in}). Esta relación puede justificarse invocando la teoría del estado de transición de una reacción, y asumiendo que existe una relación lineal directa entre la rigidez mecánica de una zona de la partícula viral, y la energía de activación necesaria ΔG^\ddagger de una transición estructural en que dicha zona está implicada:

$$\Delta G^\ddagger = C k_s \quad [\text{Ecuación 6}]$$

Donde C es un factor empírico, que dependería del virus, de la región considerada en la partícula vírica, y de la transición conformacional implicada.

De acuerdo con la ecuación de Eyring:

$$k_{in} = (K k_B T / h) e^{(-\Delta G^\ddagger / k_B T)} \quad [\text{Ecuación 7}]$$

Donde k_{in} es la constante de velocidad de la reacción; $(K k_B T / h)$ es el factor pre-exponencial, que corresponde al valor máximo de k_{in} ; K es el coeficiente de transmisión; k_B es la constante de Boltzmann; h es la constante de Planck; T es la temperatura absoluta; y ΔG^\ddagger es la diferencia entre la energía libre del estado de transición (\ddagger) y la del estado basal, es decir, la energía libre de activación de la reacción. Por tanto, sustituyendo $\Delta G^\ddagger = C k_e$ [1] en la ecuación de Eyring [2] obtenemos:

$$k_{in} = (K k_B T / h) e^{(-C k_s / k_B T)} \quad [\text{Ecuación 8}]$$

Esta expresión describe la relación exponencial encontrada experimentalmente entre k_{in} y k_s (Figura 25) para diferentes viriones mutantes en los que se han eliminado diferentes interacciones cápsida-ADN.

El mejor ajuste de los datos a la [Ecuación 6] proporcionó un valor de $C = 5,55 \times 10^{-20} \text{ m}^2$. Esto implica que por cada aumento de rigidez de 0,1 N/m en las regiones S2/S3, la energía libre de activación del cambio conformacional improductivo aumenta en 3,34 kJ/mol a 70°C en las condiciones utilizadas. Utilizando en la ecuación el valor de k_s obtenido para la región S2/S3 en la cápsida vacía (0,6 N/m) se obtiene un valor de k_{in} 19 veces mayor que para el virión completo. Por tanto, el incremento de rigidez mecánica provocado por los parches de ADN unidos a la cara interna de las cápsida se traduce en: i) un aumento de 35 kJ/mol de la energía libre de activación para la reacción de inactivación del virus y ii) en un incremento de casi 20 veces de la vida media del virión (de 67 s a 21 min) cuando es sometido a fuerte estrés térmico mediante calentamiento a 70°C.

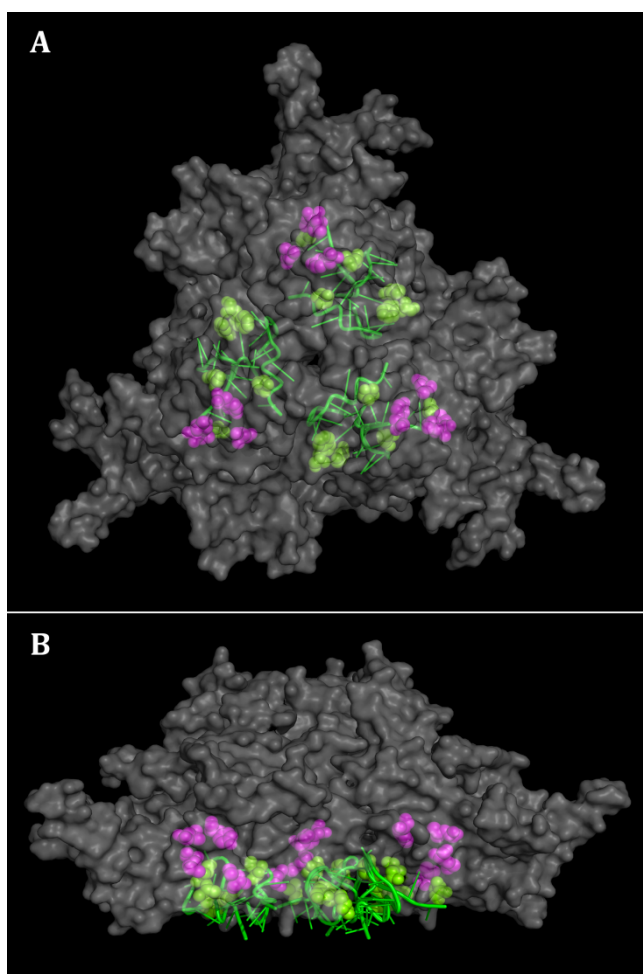


Figura 32. Localización en un trímero de la cápsida de MVM de los sitios de interacción con ADN y de cavidades. Se representa un modelo espacial translúcido del trímero visto frontalmente (A) y de perfil (B). Los segmentos de DNA (trazos) y algunos residuos que interaccionan con ellos se representan en verde. Algunos de los residuos que flanquean las cavidades mayores en la cápsida se representan en violeta.

¿Por qué existe una relación lineal entre rigidez mecánica de una región en una partícula vírica y la altura de la barrera energética de una transición estructural en la que esa región está implicada? A continuación avanzamos una posible explicación. En primer lugar, se sabe que en experimentos de estiramiento mecánico (*pulling*) es posible inducir mecánicamente transiciones estructurales en proteínas, como la disociación de complejos proteína-ligando, o el desplegamiento de polipéptidos (Fisher *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2004; Kienberger *et al.*, 2006; Borgia *et al.*, 2008; Oberhauser y Carrion-Vazquez, 2008; Jagannathan y Marqusee, 2013; Seifert y Grater, 2013). En el caso más sencillo (desplegamiento en dos estados), la barrera energética se vence cuando se aplica suficiente fuerza mecánica como para estirar la molécula una distancia que corresponde a la posición del estado de transición a lo largo de la coordenada mecánica de la reacción. La deformación molecular no-lineal observada refleja los grandes cambios que ocurren en las posiciones relativas de muchos átomos, con ruptura de interacciones no covalentes entre ellos y una reducción del efecto hidrofóbico.

Por otra parte, cuando se realizan experimentos de compresión mecánica (*pushing*) para determinar la rigidez mecánica de una partícula vírica, las partículas son deformadas como ocurre en las moléculas sujetas a estiramiento, pero en un proceso elástico, reversible. Es decir, también se estresan o se rompen (gradualmente) interacciones no covalentes y se desplazan relativamente los átomos, pero no lo bastante como para alcanzar su posición en el estado de transición y, por tanto, no se llega a disparar una transición estructural a la que la partícula pueda ser propensa (de Pablo y Mateu, 2013).

Supongamos que hacemos una modificación en una región de la partícula que aumente la fuerza global que mantiene a cada átomo de esta región cerca de su posición de equilibrio. Si esta región está implicada en un cambio conformacional, es razonable suponer que la energía libre de activación (ΔG^\ddagger) aumentará. Basándonos en el concepto básico de trabajo = fuerza (F) x distancia (d), cabe esperar que ahora sea necesario ejercer más fuerza para desplazar los átomos desde su posición de equilibrio en el estado nativo hasta su posición en el estado de transición. Por la misma razón, cabe esperar que, en experimentos de indentación, será necesario ejercer más fuerza mecánica (F) para lograr cierta deformación (d) de esa región de la partícula vírica. Puesto que $k_s = F/d$, es razonable esperar que la constante elástica (rigidez) de la región considerada y la energía libre de activación de una transición conformacional que implique esa región (ΔG^\ddagger) aumenten en paralelo linealmente, como hemos observado empíricamente.

Esta relación lineal entre k_s y ΔG^\ddagger es conceptualmente satisfactoria también para valores extremos de k_s . Si $k_s = \infty$, $\Delta G^\ddagger = \infty$. Es decir, si la región en la que ha de ocurrir el cambio conformacional fuera indeformable, los átomos no podrían moverse y sería imposible que ocurriera el cambio conformacional. Si $k_s = 0$, los átomos se moverían libremente incluso si no se aplica fuerza, no existiría barrera energética que impidiera el cambio conformacional ($\Delta G^\ddagger = 0$) y la velocidad de la reacción sería máxima [Ecuación 8].

Es importante recordar que lo que hemos encontrado experimentalmente, y justificamos conceptualmente, es una relación directa entre *variaciones* de la rigidez mecánica de una región concreta de la cápsida, y de la energía libre de activación de un cambio conformacional en la misma región, no entre valores absolutos de estos parámetros: el valor de C probablemente dependerá de la región de la partícula y la transición considerada. Hay que hacer notar también que la elasticidad intrínseca de un material viene definido por el módulo de Young, no por la constante elástica. No obstante, como estamos considerando una misma región del mismo virus la geometría no varía, de forma que los valores de k_s para los diferentes mutantes son proporcionales a sus módulos de Young y sirven para comparar su rigidez intrínseca relativa.

La buena relación exponencial entre k_s y ΔG^\ddagger ha sido planteada utilizando una serie de mutantes cuyo efecto está centrado en una zona de la cápsida y que afectan a una característica estructural concreta: las interacciones cápsida-ADN. Cuando la rigidez mecánica se modificó mediante la introducción de combinaciones de mutaciones que afectan diferentes características estructurales (regiones de interacción con ADN y cavidades (Figura 32), la relación se mantuvo, pero se desvió significativamente de la idealidad. Estas desviaciones deben ser estudiadas en profundidad, y pueden depender de aspectos como la posible existencia de cierta anisotropía en la deformabilidad de las regiones S2/S3 (Brockwell *et al.*, 2003; Carrion-Vazquez *et al.*, 2003) y de posibles diferencias entre el conjunto de átomos desplazados por la indentación y el de aquellos implicados en la transición estructural considerada. Si la anisotropía mecánica no es excesiva y muchos de los átomos desplazados por la indentación intervienen en la transición observada, es esperable que las desviaciones sobre la idealidad entre k_s y ΔG^\ddagger , de haberlas, sean limitadas, como hemos observado empíricamente.

Desde el punto de vista de la biología viral, estos resultados apoyan la hipótesis de que la distribución anisotrópica de la rigidez mecánica de MVM tiene un papel biológico y ha sido seleccionada evolutivamente. MVM parece haber adquirido en la cara interna de su cápsida sitios de unión de segmentos de ADN. Esta unión provoca la rigidificación

mecánica de éstas zonas (S2/S3), dificultando un cambio conformacional del virión, inducido por calor, que provoca su inactivación. Sin embargo, las regiones S5 permanecen libres de ADN, y por tanto se mantienen lo suficientemente elásticas como para permitir un cambio conformacional diferente, relacionado con la apertura de los poros de la cápsida, que es necesario para la viabilidad del virión (Castellanos *et al.*, 2012a).

Interfases proteína-proteína y rigidez mecánica de MVM

El análisis mutacional descrito en el apartado 4.4 permite extraer una serie de conclusiones sobre la relación entre estructura detallada y propiedades mecánicas (específicamente, rigidez) de una partícula vírica:

i) la rigidez mecánica de la cápsida de MVM es extremadamente sensible a cambios individuales en las interfases entre trímeros.

ii) la gran mayoría de las cadenas laterales interfásicas analizadas no contribuye a mantener la elasticidad de las regiones S5 donde se sitúan los poros.

iii) La gran mayoría de las cadenas laterales interfásicas analizadas contribuye decisivamente a mantener la elasticidad de las regiones S2 y S3; si se eliminan individualmente por mutación a alanina estas cadenas laterales, las regiones S2 y S3 de la cápsida se rigidifican en casi todos los casos analizados. Esta rigidificación no ocurre cuando se eliminan cadenas laterales que no se encuentran en las interfases y que están expuestas al solvente hacia el interior de la partícula, sin establecer contactos con residuos vecinos (Carrasco *et al.*, 2008).

iv) este efecto rigidificante de las mutaciones en las interfases entre trimeros no depende del tipo y número de interacciones no covalentes intertriméricas eliminadas: ocurre tanto si se eliminan puentes de hidrógeno, como enlaces iónicos, múltiples contactos de van der Waals, incluyendo contactos “hidrofóbicos” C-C, o combinaciones de estas interacciones; ocurre incluso cuando se eliminan solamente uno o dos contactos de van der Waals intertriméricos.

v) El efecto rigidificante de la eliminación de una cadena lateral interfásica sobre la región S2 situada en el centro de la interfase entre cada par de trímeros, depende claramente de la posición del residuo analizado (Figura 30): la rigidificación de S2 es elevada (en promedio, un incremento cercano al 50%) cuando se eliminan cadenas laterales con un fuerte componente hidrofóbico, generalmente enterradas (en parte al menos) a lo largo de la línea principal de contacto frontal entre trímeros (grupo R, color rojo en Figura 30); en cambio, la rigidificación de S2 es pequeña (en promedio, un 8%) cuando se eliminan cadenas laterales que en su gran mayoría son de carácter polar y están

situadas fuera de la línea de contacto frontal entre trímeros, en bucles que sobresalen del cuerpo del trímero hacia la superficie de la cápsida, y que contactan de modo más o menos laxo, con residuos de trímeros vecinos (grupo E, color cyan en Figura 30). La representación de factores de temperatura (factores B) para los C α en la estructura cristalográfica de la cápsida de MVM (Figura 33) refleja claramente la mayor movilidad de los bucles de VP2 donde se localizan los residuos del grupo E, frente a la menor movilidad de los elementos estructurales donde se localizan los residuos del grupo R.

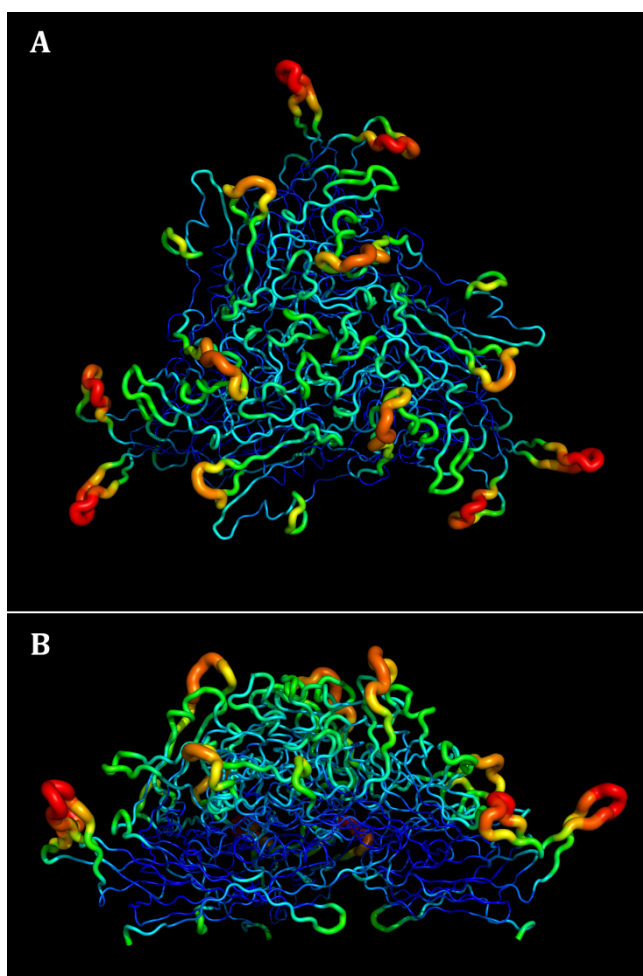


Figura 33. Representación gráfica de factores B en la estructura cristalográfica de un trímero de la cápsida de MVM. Se representa un modelo de cinta del trímero visto frontalmente (A) y de perfil (B). El valor del factor B para cada C α se representa según la anchura de la cinta y un espectro de color que va desde una anchura mínima y color azul oscuro (factor B mínimo), hasta una anchura máxima y color rojo oscuro (factor B máximo).

vi) El efecto diferencial de mutaciones de residuos de los grupos R o E sobre la rigidez local también se aprecia en las regiones S3 situadas lejos de las interfases, en el centro de los trímeros (Figura 30); sin embargo, la diferencia entre grupos en cuanto a su efecto sobre la rigidez es menor para S3 que para S2.

vii) De modo consistente con lo observado con virus más complejos (Hernando-Perez *et al.*, 2014a; Hernando-Perez *et al.*, 2014b), no se observa una relación entre estabilidad térmica frente a la disociación y rigidez mecánica. Independientemente de su

mayor o menor efecto sobre la rigidez mecánica, ninguna de las mutaciones ensayadas en las interfases entre trímeros aumentó la estabilidad de la cápsida frente a su disociación por calor.

Cuando se comparan los resultados de este análisis mecánico para residuos en las interfases entre trímeros con los resultados previos obtenidos en un análisis similar para otros residuos de la cápsida de MVM, se observan interesantes similitudes y diferencias: En primer lugar, la eliminación de la cadena lateral de residuos situados en la base de los poros en S5 (Figura 26, color azul) también provoca, como las mutaciones tipo R a lo largo de las interfases, un aumento sustancial en la rigidez mecánica de S2 y S3, aunque estas mutaciones son prácticamente las únicas que rigidifican además la región S5. La mayoría de estos residuos en S5, aunque no todos, forman parte también de las interfases entre trímeros, pero a diferencia de los demás residuos interfásicos analizados, forman un subgrupo discreto en la pared interna de la cápsida, claramente separado de los demás residuos interfásicos (Figura 26). En segundo lugar, las mutaciones de residuos que flanquean cavidades en la cápsida, y que alteran el volumen y/o la forma de estas (Figura 32, color violeta), independientemente de que aumenten o disminuyan el volumen de la cavidad, también rigidifican en la gran mayoría de los casos las regiones S2 y S3 (no las S5).

Todas estas observaciones nos llevan a proponer un modelo tentativo para explicar estructuralmente los efectos mecánicos observados por mutación de residuos de la cápsida de MVM (Figura 34). La cápsida parece haber evolucionado de tal modo que se encuentra cerca de un máximo de elasticidad. Las diferentes mutaciones ensayadas en nuestro laboratorio que eliminan grupos químicos en interfases entre subunidades, o en la base de los poros, o que eliminan o introducen grupos químicos que aumentan o reducen el tamaño de cavidades, casi invariablemente aumentan la rigidez mecánica de la cápsida. Si la cápsida no se encontrara cerca de un máximo de elasticidad, sería de esperar que al menos algunas de estas mutaciones aumentarían, no reducirían, la elasticidad.

El aumento de rigidez observado no depende del número y tipo de interacciones eliminadas. Por tanto, el mantenimiento de la cápsida cerca de este máximo de elasticidad se debería en buena medida a un numeroso conjunto de grupos químicos situados en interfases entre subunidades, o alrededor de poros o cavidades. Cuando cualquiera de estos grupos se elimina por mutación, en la zona que ocupaba el grupo eliminado se crea una pequeña cavidad (60 en posiciones equivalentes en la cápsida). En el contexto estructural de la cápsida de MVM (producto de la evolución biológica), la aparición de estas cavidades, de modo casi independiente de su origen y posición, implicaría una ligera

reordenación de átomos de la cápsida que llevaría a una mayor compactación estructural general en estas zonas interfásicas (interfases entre trímeros, poros, cavidades); esta mayor compactación sería la causante de un incremento de rigidez en regiones S2 y S3 (de modo general) y también en la región S5 (en el caso de mutaciones en la base de los poros).

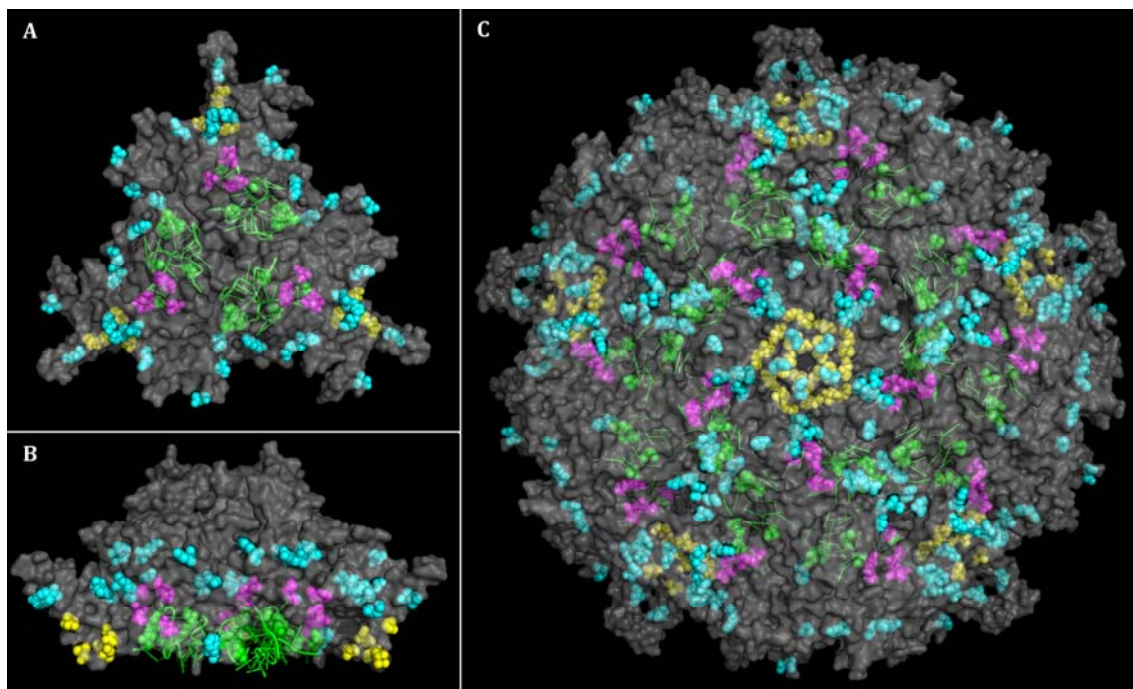


Figura 34. Localización de todos los residuos estudiados hasta el momento implicados en las propiedades mecánicas de MVM. En los 3 paneles se muestran los mismo residuos en el mismo código de colores: en amarillo los residuos de la base del poro; en cian los residuos de la interfase intertrímeros; en verde los residuos que interaccionan con el ADN (también en verde pero en representación de “esqueleto”); y en magenta los residuos de las cavidades. **A)** Trímero visto de frente. **B)** Trímero visto de lado. **C)** Pentámero de trímeros con un poro localizado en el centro de la imagen.

Este modelo hipotético viene apoyado por los resultados preliminares de una comparación de las estructuras cristalográficas de la cápsida de MVM no mutada con la del mutante N170A, que acaba de ser resuelta por el grupo de la Dra. N. Verdaguer en colaboración con nosotros (J.Querol, A.Rodríguez-Huete, M.G.Mateu y N.Verdaguer, resultados no publicados). El residuo N170 se encuentra en la interfase intertrimérica, y forma parte también del grupo de residuos situados en la base de los poros en S5. La mutación N170A incrementa notablemente la rigidez global de la cápsida (de las regiones S5, S2 y S3). La estructura cristalográfica de la cápsida mutante N170A muestra ligeras reorganizaciones estructurales en la pared de los poros, una cierta reducción del tamaño del poro, y una disminución en los factores de temperatura (factores B) de átomos en la región del poro, con respecto a los de la cápsida no mutada. Además, también se observan

ligeras reorganizaciones estructurales y disminución de factores B en regiones alejadas de los poros. El conjunto de estas reorganizaciones da como resultado una estructura que parece ligeramente más compactada en diferentes regiones (no solo en la región de la mutación). Estas observaciones deben aún confirmarse mediante un análisis más definitivo de la estructura de este mutante (en curso). En un futuro estudio pretendemos analizar si la eliminación de otros grupos químicos en zonas interfásicas de la cápsida de MVM que rigidifican igualmente la cápsida producen un efecto de compactación global similar al de la mutación N170A.

¿Qué posible presión selectiva podría mantener la cápsida de MVM cerca de un máximo de elasticidad global? La ventaja selectiva de mantener elásticas las regiones de los poros (S5) ya ha sido aclarada (Castellanos *et al.*, 2012a). Sin embargo, no sabemos qué ventaja selectiva podría mantener elásticas las regiones S2 y S3 de la cápsida. En el virión, la rigidificación de estas regiones, y no el mantenimiento de su elasticidad, presenta una clara ventaja biológica al incrementar la resistencia térmica frente a la inactivación (apartado 4.3.1). En el laboratorio, si se eliminan las interacciones cápsida-ADN en el virión, puede conseguirse fácilmente restaurar la mayor rigidez de S2 y S3 mediante la alteración el volumen de las cavidades de la cápsida (o, probablemente, mediante sustituciones de aminoácidos en las interfases intertriméricas). Sin embargo, en la naturaleza MVM parece haber “elegido”, para incrementar su resistencia térmica, la creación de interacciones cápsida-ADN; en lugar de la modificación de las cavidades o de las interfases intertrímeros.

Por lo tanto, parece que debe existir alguna ventaja selectiva en el mantenimiento de una relativamente elevada elasticidad de las regiones S2 y S3 de la cápsida vacía. La relación hallada para el virión de MVM entre elasticidad mecánica de las regiones S5 y dinámica conformacional local sugiere la posibilidad de que, de modo análogo, se requiera cierto dinamismo conformacional de las regiones S2 y S3 de la cápsida vacía (no del virión) para facilitar algún proceso del ciclo viral en que aquella está implicada. Por ejemplo, su ensamblaje o el empaquetamiento del genoma. Según esta hipótesis, las mutaciones que rigidifican las regiones S2 y S3 de la cápsida vacía deberían ser biológicamente desfavorables. En este sentido, hemos observado que la mayoría de estas mutaciones, especialmente entre las que aumentan más la rigidez de S2/S3, reducen la infectividad del virión. Sin embargo, algunas no afectan significativamente a la infectividad, aunque podrían tener un efecto desfavorable sobre la eficacia biológica (en estudio). Un posibilidad podría ser que el virión necesite que la cápsida sea más blanda en el momento

de la desencapsidación de ADN, es decir, que en la regulación de la liberación del genoma estén implicadas las propiedades mecánicas de la cápsida, como parece suceder en BMV, en el cual se ha comprobado que partículas víricas con distintos grados de elasticidad mecánica tienen distinta propensión a liberar su genoma (Vaughan *et al.*, 2014). En todo caso, no hemos observado una correlación clara que permita proponer una conexión inequívoca entre flexibilidad mecánica de las regiones S2 y S3 de la cápsida e infectividad de MVM, al menos en condiciones de laboratorio. Desde luego, no es necesario que una mutación afecte a la infectividad o la eficacia biológica en estas condiciones para que pueda presentar una desventaja selectiva en el medio natural. De hecho, las mutaciones que reducen la rigidez de las regiones S2/S3 del virión y la resistencia de este a la inactivación térmica no afectan en general a la infectividad, pero presentan una clara desventaja selectiva en la naturaleza, donde el virión puede estar sometido a extremos de temperatura durante su propagación de un organismo a otro.

En conclusión, nuestros estudios sobre los determinantes moleculares de la rigidez o elasticidad mecánica de MVM revelan, entre otros aspectos: i) una relación cuantitativa entre rigidez mecánica local de un virión y propensión a sufrir una transición estructural; ii) un papel biológico para la rigidificación local del virión a través de interacciones cápsida-ADN; iii) un papel importante en el mantenimiento de la elasticidad mecánica de la cápsida de residuos situados a lo largo de interfases entre subunidades triméricas de la cápsida, especialmente de aquellos localizados en la zona de contacto frontal entre trímeros; iv) un mecanismo estructural tentativo para explicar de modo general el efecto mecánico de mutaciones que aumentan la rigidez global de la cápsida, basado en facilitación de la compactación de la estructura mediante la creación de pequeñas cavidades resultantes de la mutación. v) la posibilidad de que la cápsida de MVM (no el virión) haya evolucionado en respuesta a alguna presión selectiva que favorece la adquisición de un máximo de elasticidad mecánica global.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. La presencia y distribución de residuos eléctricamente cargados en la pared interna de la cápsida de MVM no es en general relevante para el ensamblaje de la partícula o para la infectividad del virión. Sin embargo, anillos de residuos cargados negativamente situados alrededor de los poros de la cápsida resultan críticos para la dinámica conformacional asociada a los mismos y para la infectividad. Tanto las cadenas laterales como la presencia de carga negativa contribuyen al papel biológico de estos anillos de residuos.
2. El desensamblaje mecánico de la cápsida de MVM en experimentos de molécula única mediante AFM ha permitido identificar diversos intermediarios, que concuerdan con los intermediarios transitorios predichos por diversos estudios teóricos para el proceso reversible de ensamblaje/desensamblaje de virus icosaédricos sencillos. Estos intermediarios incluyen cápsidas casi completas carentes de un trímero, cápsidas carentes de un pentámero de trímeros, y pentámeros de trímeros.
3. Se ha identificado una relación cuantitativa entre una disminución de la rigidez mecánica de las regiones S2 y S3 del virión de MVM causada por la eliminación de interacciones con el ADN vírico, y un aumento en la propensión de éste a sufrir un cambio estructural mediado por calor que inactiva su capacidad infectiva. La aplicación de la teoría del estado de transición indica que existe una relación lineal entre rigidez mecánica de una región del virión y la barrera energética de una transición estructural en la que esa región está implicada.
4. Se refuerza la hipótesis, avanzada por nuestro grupo, sobre un papel biológico para la distribución anisotrópica de la elasticidad mecánica en el virión de MVM. Las interacciones cápsida-ADN rigidifican localmente la partícula vírica, dificultando un cambio estructural que provoca su inactivación térmica. Las regiones de los poros se mantienen libres de ADN y mecánicamente elásticas, lo que preserva una transición conformacional asociada a la dinámica de los poros y necesaria para la infección.
5. La disminución de la resistencia de MVM frente a inactivación térmica causada por el aumento de elasticidad local debido a la eliminación de interacciones cápsida-ADN puede ser compensada mediante la introducción alrededor de cavidades vecinas de mutaciones que rigidifican la cápsida. Sin embargo, no parece que el virus haya utilizado durante su evolución este mecanismo de rigidificación como alternativa al establecimiento de interacciones con el ADN.
6. Residuos situados generalmente en elementos de estructura secundaria en la proteína de la cápsida de MVM, y situados a lo largo de las líneas principales de las interfases entre trímeros, ejercen un papel importante en el mantenimiento de la elasticidad mecánica de la cápsida. La eliminación individual de la cadena lateral de residuos de la cápsida implicados en estas interfases provoca casi invariablemente aumentos locales o globales de rigidez mecánica. La cápsida de MVM parece haber evolucionado hacia un máximo de elasticidad mecánica.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. and Brown, F. (1989) 'The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution', *Nature* 337(6209): 709-16.
- Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A. L., Wang, F., Tattersall, P. and Rossmann, M. G. (1998) 'Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice', *Structure* 6(11): 1369-81.
- Agbandje-McKenna, M. and McKenna, R. (2011) *Structural Virology*, Cambridge, UK: RCS Publishing.
- Agbandje, M. and Chapman, M. S. (2006) Correlating structure with function in the viral capsid. en: *Parvoviruses*. J. K. Kerr M. E. Cotmore R. M. Bloom C. R. Linden and C. R. Parrish (eds.). New York: Arnold.
- Almendral, J. M. (2006) Parvoviridae. en *Virus patógenos*. L. Carrasco and J. M. Almendral (eds.). Madrid: Hélice.
- Almendral, J. M. (2013) Assembly of simple Icosahedral Viruses. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.). Springer. Dordrecht, The Netherlands
- Ambrose, Z. and Aiken, C. (2014) 'HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins', *Virology* 454-455: 371-9.
- Annamalai, P., Apte, S., Wilkens, S. and Rao, A. L. (2005) 'Deletion of highly conserved arginine-rich RNA binding motif in cowpea chlorotic mottle virus capsid protein results in virion structural alterations and RNA packaging constraints', *J Virol* 79(6): 3277-88.
- Arkhipov, A., Roos, W. H., Wuite, G. J. and Schulten, K. (2009) 'Elucidating the mechanism behind irreversible deformation of viral capsids', *Biophys J* 97(7): 2061-9.
- Astell, C. R., Mol, C. D. and Anderson, W. F. (1987) 'Structural and functional homology of parvovirus and papovavirus polypeptides', *J Gen Virol* 68 (Pt 3): 885-93.
- Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S. and Middaugh, C. R. (2006) 'Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature', *J Biol Chem* 281(28): 19478-88.
- Axblom, C., Tars, K., Fridborg, K., Orna, L., Bundule, M. and Liljas, L. (1998) 'Structure of phage ϕ capsids with a deletion in the FG loop: implications for viral assembly', *Virology* 249(1): 80-8.
- Baclayon, M., Shoemaker, G. K., Uetrecht, C., Crawford, S. E., Estes, M. K., Prasad, B. V., Heck, A. J., Wuite, G. J. and Roos, W. H. (2011) 'Prestress strengthens the shell of Norwalk virus nanoparticles', *Nano Lett* 11(11): 4865-9.
- Bancroft, J. B., Hiebert, E. and Bracker, C. E. (1969) 'The effects of various polyanions on shell formation of some spherical viruses', *Virology* 39(4): 924-30.

- Baro, A. M., Miranda, R., Alaman, J., Garcia, N., Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. and Carrascosa, J. L. (1985) 'Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy', *Nature* 315(6016): 253-4.
- Belnap, D. M., Filman, D. J., Trus, B. L., Cheng, N., Booy, F. P., Conway, J. F., Curry, S., Hiremath, C. N., Tsang, S. K., Steven, A. C. *et al.* (2000) 'Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus', *J Virol* 74(3): 1342-54.
- Belyi, V. A. and Muthukumar, M. (2006) 'Electrostatic origin of the genome packing in viruses', *Proc Natl Acad Sci USA* 103(46): 17174-8.
- Berns, K. I. (1983) *The parvoviruses*, NY: Plenum Press.
- Berns, K. I. and Young, N. S. (1995) Parvoviridae. en *Virology*. B. N. Fields D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.). Philadelphia, NY: Lippincott-Raven Publishers.
- Bink, H. H. and Pleij, C. W. (2002) 'RNA-protein interactions in spherical viruses', *Arch Virol* 147(12): 2261-79.
- Binnig, G., Quate, C. F. and Gerber, C. (1986) 'Atomic force microscope', *Phys Rev Lett* 56(9): 930-933.
- Bittner, A., Alonso, J. M., Górzny, M. L. and Wege, C. (2013) Nanoscale Science and Technology with Plant Viruses and Bacteriophages. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.). Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Boissy, R. and Astell, C. R. (1985) 'An Escherichia coli recBCsbcBrecF host permits the deletion-resistant propagation of plasmid clones containing the 5'-terminal palindrome of minute virus of mice', *Gene* 35(1-2): 179-85.
- Bonnard, G. D., Manders, E. K., Campbell, D. A., Jr., Herberman, R. B. and Collins, M. J., Jr. (1976) 'Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma. Evidence for minute virus of mice causing the inhibition', *J Exp Med* 143(1): 187-205.
- Borgia, A., Williams, P. M. and Clarke, J. (2008) 'Single-molecule studies of protein folding', *Annu Rev Biochem* 77: 101-25.
- Bothner, B., Dong, X. F., Bibbs, L., Johnson, J. E. and Siuzdak, G. (1998) 'Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry', *J Biol Chem* 273(2): 673-6.
- Bothner, B. and Hilmer, J. K. (2011) Probing Viral Capsids in Solution. en *Structural Virology*. M. Agbandje-McKenna and R. McKenna (eds.). Cambridge, UK.: RCS Publishing.
- Bourne, C. R., Finn, M. G. and Zlotnick, A. (2006) 'Global structural changes in hepatitis B virus capsids induced by the assembly effector HAP1', *J Virol* 80(22): 11055-61.
- Brockwell, D. J., Paci, E., Zinober, R. C., Beddard, G. S., Olmsted, P. D., Smith, D. A., Perham, R. N. and Radford, S. E. (2003) 'Pulling geometry defines the mechanical resistance of a beta-sheet protein', *Nat Struct Biol* 10(9): 731-7.
- Brun, S., Chaloin, L., Gay, B., Bernard, E., Devaux, C., Lionne, C., Chazal, N. and Briant, L. (2010) 'Electrostatic repulsion between HIV-1 capsid proteins modulates hexamer plasticity and in vitro assembly', *Proteins* 78(9): 2144-56.

- Bustamante, C., Chemla, Y. R., Forde, N. R. and Izhaky, D. (2004) 'Mechanical processes in biochemistry', *Annu Rev Biochem* 73: 705-48.
- Carrasco, C. (2008) Caracterización estructural y mecánica de nanosistemas biológicos mediante microscopía de fuerzas atómicas. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Carrasco, C., Carreira, A., Schaap, I. A., Serena, P. A., Gomez-Herrero, J., Mateu, M. G. and de Pablo, P. J. (2006) 'DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus', *Proc Natl Acad Sci USA* 103(37): 13706-11.
- Carrasco, C., Castellanos, M., de Pablo, P. J. and Mateu, M. G. (2008) 'Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering', *Proc Natl Acad Sci USA* 105(11): 4150-5.
- Carrasco, C., Douas, M., Miranda, R., Castellanos, M., Serena, P. A., Carrascosa, J. L., Mateu, M. G., Marques, M. I. and de Pablo, P. J. (2009) 'The capillarity of nanometric water menisci confined inside closed-geometry viral cages', *Proc Natl Acad Sci USA* 106(14): 5475-80.
- Carrasco, C., Luque, A., Hernando-Perez, M., Miranda, R., Carrascosa, J. L., Serena, P. A., de Ridder, M., Raman, A., Gomez-Herrero, J., Schaap, I. A. *et al.* (2011) 'Built-in mechanical stress in viral shells', *Biophys J* 100(4): 1100-8.
- Carrascosa, A. L. (1994) 'Enhancement of baculovirus plaque assay in insect cell monolayers by DEAE-dextran', *Biotechniques* 16(6): 1078-81, 1083-5.
- Carrascosa, A. L., Sastre, I. and Vinuela, E. (1995) 'Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12', *J Biotechnol* 40(2): 73-86.
- Carreira, A. and Mateu, M. G. (2006) 'Structural tolerance versus functional intolerance to mutation of hydrophobic core residues surrounding cavities in a parvovirus capsid', *J Mol Biol* 360(5): 1081-93.
- Carreira, A., Menendez, M., Reguera, J., Almendral, J. M. and Mateu, M. G. (2004) 'In vitro disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops', *J Biol Chem* 279(8): 6517-25.
- Carrillo-Tripp, M., Shepherd, C. M., Borelli, I. A., Venkataraman, S., Lander, G., Natarajan, P., Johnson, J. E., Brooks, C. L., 3rd and Reddy, V. S. (2009) 'VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology', *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D436-42.
- Carrillo, E. C., Giachetti, C. and Campos, R. (1985) 'Early steps in FMDV replication: further analysis on the effects of chloroquine', *Virology* 147(1): 118-25.
- Carrion-Vazquez, M., Li, H., Lu, H., Marszalek, P. E., Oberhauser, A. F. and Fernandez, J. M. (2003) 'The mechanical stability of ubiquitin is linkage dependent', *Nat Struct Biol* 10(9): 738-43.
- Caspar, D. L. and Klug, A. (1962) 'Physical principles in the construction of regular viruses', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 27: 1-24.
- Caspar, D. L. and Namba, K. (1990) 'Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus', *Adv Biophys* 26: 157-85.

- Castellanos, M. (2011) Análisis mutacional de propiedades estructurales y mecánicas del virus diminuto del ratón, y de sus implicaciones biológicas. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Castellanos, M., Carrillo, P. J. P. and Mateu, M. G. (2015) 'Quantitatively probing propensity for structural transitions in engineered virus nanoparticles by single-molecule mechanical analysis', *Nanoscale*. In press.
- Castellanos, M., Perez, R., Carrasco, C., Hernando-Perez, M., Gomez-Herrero, J., de Pablo, P. J. and Mateu, M. G. (2012a) 'Mechanical elasticity as a physical signature of conformational dynamics in a virus particle', *Proc Natl Acad Sci USA* 109(30): 12028-33.
- Castellanos, M., Perez, R., Carrillo, P. J., de Pablo, P. J. and Mateu, M. G. (2012b) 'Mechanical disassembly of single virus particles reveals kinetic intermediates predicted by theory', *Biophys J* 102(11): 2615-24.
- Caston, J. R. (2013) Conventional Electron Microscopy, Cryo-Electron Microscopy and Cryo-Electron Tomography of Viruses. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.). Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Ceres, P. and Zlotnick, A. (2002) 'Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids', *Biochemistry* 41(39): 11525-31.
- Cilia, M., Johnson, R., Sweeney, M., DeBlasio, S. L., Bruce, J. E., MacCoss, M. J. and Gray, S. M. (2014) 'Evidence for lysine acetylation in the coat protein of a poliovirus', *J Gen Virol* 95(Pt 10): 2321-7.
- Clare, D. K. and Orlova, E. V. (2010) '4.6Å Cryo-EM reconstruction of tobacco mosaic virus from images recorded at 300 keV on a 4k x 4k CCD camera', *J Struct Biol* 171(3): 303-8.
- Clare, D. K., Stagg, S., Quispe, J., Farr, G. W., Horwich, A. L. and Saibil, H. R. (2008) 'Multiple states of a nucleotide-bound group 2 chaperonin', *Structure* 16(4): 528-34.
- Comolli, L. R., Spakowitz, A. J., Siegerist, C. E., Jardine, P. J., Grimes, S., Anderson, D. L., Bustamante, C. and Downing, K. H. (2008) 'Three-dimensional architecture of the bacteriophage phi29 packaged genome and elucidation of its packaging process', *Virology* 371(2): 267-77.
- Conway, J. F., Wikoff, W. R., Cheng, N., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Johnson, J. E. and Steven, A. C. (2001) 'Virus maturation involving large subunit rotations and local refolding', *Science* 292(5517): 744-8.
- Cotmore, S. F., Hafenstein, S. and Tattersall, P. (2010) 'Depletion of virion-associated divalent cations induces parvovirus minute virus of mice to eject its genome in a 3'-to-5' direction from an otherwise intact viral particle', *J Virol* 84(4): 1945-56.
- Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (1987) 'The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates', *Adv Virus Res* 33: 91-174.
- Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (2005) 'Encapsidation of minute virus of mice DNA: aspects of the translocation mechanism revealed by the structure of partially packaged genomes', *Virology* 336(1): 100-12.

- Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (2007) 'Parvoviral host range and cell entry mechanisms', *Adv Virus Res* 70: 183-232.
- Cotmore, S. F. and Tattersall, P. J. (2014) 'Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple', *Annu Rev Virol* 1(1): 517-37.
- Crawford, L. V. (1966) 'A minute virus of mice', *Virology* 29(4): 605-12.
- Cuellar, J. L., Meinhoefel, F., Hoehne, M. and Donath, E. (2010) 'Size and mechanical stability of norovirus capsids depend on pH: a nanoindentation study', *J Gen Virol* 91(Pt 10): 2449-56.
- Culver, J. N. (2002) 'Tobacco mosaic virus assembly and disassembly: determinants in pathogenicity and resistance', *Annu Rev Phytopath* 40: 287-308.
- Chapman, M. S. and Rossmann, M. G. (1993) 'Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses', *Virology* 194(2): 491-508.
- Chen, C., Kao, C. C. and Dragnea, B. (2008) 'Self-assembly of brome mosaic virus capsids: insights from shorter time-scale experiments', *J Phys Chem A* 112(39): 9405-12.
- Chiu, W., Burnett, R. M. and Garcea, R. L. (1997) 'Structural biology of viruses' Oxford University Press, Oxford, UK.
- Chow, M., Basavappa, R. and Hogle, J. M. (1997) The role of conformational transitions y Poliovirus pathogenesis en *Structural Biology of Viruses*. W. Chiu R. M. Burnett and R. L. Garcea (eds.).Oxford University Press. Oxford, UK.
- Christensen, J. and Tattersall, P. (2002) 'Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system', *J Virol* 76(13): 6518-31.
- Dai, W., Fu, C., Raytcheva, D., Flanagan, J., Khant, H. A., Liu, X., Rochat, R. H., Haase-Pettingell, C., Piret, J., Ludtke, S. J. *et al.* (2013) 'Visualizing virus assembly intermediates inside marine cyanobacteria', *Nature* 502(7473): 707-10.
- De Pablo, P., Colchero, J., Gomez-Herrero, J. and Baro, A. (1998) 'Jumping mode scanning force microscopy', *Appl Phys Lett* 73(22): 3300-3302.
- de Pablo, P. J. (2013) 'Atomic force microscopy of viruses', *Subcell Biochem* 68: 247-71.
- de Pablo, P. J. and Carrion-Vazquez, M. (2014) 'Imaging biological samples with atomic force microscopy', *Cold Spring Harb Protoc* 2014(2): 167-77.
- de Pablo, P. J. and Mateu, M. G. (2013) Mechanical properties of viruses. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.): Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- del Alamo, M. and Mateu, M. G. (2005) 'Electrostatic repulsion, compensatory mutations, and long-range non-additive effects at the dimerization interface of the HIV capsid protein', *J Mol Biol* 345(4): 893-906.
- del Alamo, M., Neira, J. L. and Mateu, M. G. (2003) 'Thermodynamic dissection of a low affinity protein-protein interface involved in human immunodeficiency virus assembly', *J Biol Chem* 278(30): 27923-9.

- del Alamo, M., Rivas, G. and Mateu, M. G. (2005) 'Effect of macromolecular crowding agents on human immunodeficiency virus type 1 capsid protein assembly in vitro', *J Virol* 79(22): 14271-81.
- DeLano (2002) The Pymol Molecular Graphics System., San Carlos, CA, USA.
- Delgui, L. R. and Rodríguez, J. F. (2013) Virus Maturation. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.). Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Devkota, B., Petrov, A. S., Lemieux, S., Boz, M. B., Tang, L., Schneemann, A., Johnson, J. E. and Harvey, S. C. (2009) 'Structural and electrostatic characterization of pariacoto virus: implications for viral assembly', *Biopolymers* 91(7): 530-8.
- Domitrovic, T., Movahed, N., Bothner, B., Matsui, T., Wang, Q., Doerschuk, P. C. and Johnson, J. E. (2013) 'Virus assembly and maturation: auto-regulation through allosteric molecular switches', *J Mol Biol* 425(9): 1488-96.
- Douglas, C. C., Thomas, D., Lanman, J. and Prevelige, P. E., Jr. (2004) 'Investigation of N-terminal domain charged residues on the assembly and stability of HIV-1 CA', *Biochemistry* 43(32): 10435-41.
- Douglas, T. and Young, M. (2006) 'Viruses: making friends with old foes', *Science* 312(5775): 873-5.
- Doyle, A., Morris, C. B. and Armitage, W. J. (1988) 'Cryopreservation of animal cells', *Adv Biotechnol Processes* 7: 1-17.
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y. and Liang, J. (2006) 'CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues', *Nucleic acids research* 34: 116-8.
- Durham, A. C., Finch, J. T. and Klug, A. (1971) 'States of aggregation of tobacco mosaic virus protein', *Nature New biology* 229(2): 37-42.
- Ellard, F. M., Drew, J., Blakemore, W. E., Stuart, D. I. and King, A. M. (1999) 'Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids', *J Gen Virol* 80 (Pt 8): 1911-8.
- Engers, H. D., Louis, J. A., Zubler, R. H. and Hirt, B. (1981) 'Inhibition of T cell-mediated functions by MVM(i), a parvovirus closely related to minute virus of mice', *J Immunol* 127(6): 2280-5.
- Evilevitch, A., Roos, W. H., Ivanovska, I. L., Jeembaeva, M., Jonsson, B. and Wuite, G. J. (2011) 'Effects of salts on internal DNA pressure and mechanical properties of phage capsids', *J Mol Biol* 405(1): 18-23.
- Fane, B. A. and Prevelige, P. E., Jr. (2003) 'Mechanism of scaffolding-assisted viral assembly', *Adv Protein Chem* 64: 259-99.
- Farr, G. A., Cotmore, S. F. and Tattersall, P. (2006) 'VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice', *J Virol* 80(1): 161-71.
- Farr, G. A. and Tattersall, P. (2004) 'A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection', *Virology* 323(2): 243-56.

- Fisher, T. E., Marszalek, P. E. and Fernandez, J. M. (2000) 'Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope', *Nat Struct Biol* 7(9): 719-24.
- Flint, S. J., Racaniello, V., Enquist, L. and Skalka, A. M. (2009) *Principles of virology*.: ASM press. Washington.
- Foguel, D., Teschke, C. M., Prevelige, P. E., Jr. and Silva, J. L. (1995) 'Role of entropic interactions in viral capsids: single amino acid substitutions in P22 bacteriophage coat protein resulting in loss of capsid stability', *Biochemistry* 34(4): 1120-6.
- Forrey, C. and Muthukumar, M. (2009) 'Electrostatics of capsid-induced viral RNA organization', *J Chem Phys* 131(10): 105101.
- Fox, J. M., Wang, G., Speir, J. A., Olson, N. H., Johnson, J. E., Baker, T. S. and Young, M. J. (1998) 'Comparison of the native CCMV virion with in vitro assembled CCMV virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction', *Virology* 244(1): 212-8.
- Fricks, C. E. and Hogle, J. M. (1990) 'Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding', *J Virol* 64(5): 1934-45.
- Fry, E. E., Stuart, D. I. and Rowlands, D. J. (2005) 'The structure of foot-and-mouth disease virus', *Curr Top Microbiol Immunol* 288: 71-101.
- Fuller, D. N., Rickgauer, J. P., Jardine, P. J., Grimes, S., Anderson, D. L. and Smith, D. E. (2007) 'Ionic effects on viral DNA packaging and portal motor function in bacteriophage phi 29', *Proc Natl Acad Sci USA* 104(27): 11245-50.
- Garcia-Doval, C., Luque, D., Caston, J. R., Boulanger, P. and van Raaij, M. J. (2013) 'Crystallization of the C-terminal domain of the bacteriophage T5 L-shaped fibre', *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 69(Pt 12): 1363-7.
- Gardiner, E. M. and Tattersall, P. (1988) 'Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice', *J Virol* 62(8): 2605-13.
- Garmann, R. F., Comas-Garcia, M., Koay, M. S., Cornelissen, J. J., Knobler, C. M. and Gelbart, W. M. (2014) 'The Role of Electrostatics in the Assembly Pathway of a Single-Stranded RNA Virus', *J Virol*.
- Germond, J. E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. (1975) 'Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40', *Proc Natl Acad Sci USA* 72(5): 1843-7.
- Gosset, W. S. (1908) 'The probable error of a mean', *Biometrika*: 6(1):1-25.
- Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W. and Helenius, A. (1997) 'The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry', *EMBO J* 16(19): 5998-6007.
- Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P. and Helenius, A. (1993) 'Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells', *Cell* 75(3): 477-86.
- Grueso, E. (2006) Modificaciones de dominios funcionales de la cápsida del parvovirus MVM con péptidos heterólogos: efectos en oncotropismo y ciclo viral. . Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.

- Grunewald, K., Desai, P., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Belnap, D. M., Baumeister, W. and Steven, A. C. (2003) 'Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography', *Science* 302(5649): 1396-8.
- Hagan, M. F. and Chandler, D. (2006) 'Dynamic pathways for viral capsid assembly', *Biophys J* 91(1): 42-54.
- Hernando-Perez, M., Lambert, S., Nakatani-Webster, E., Catalano, C. E. and de Pablo, P. J. (2014a) 'Cementing proteins provide extra mechanical stabilization to viral cages', *Nat Commun* 5: 4520.
- Hernando-Perez, M., Miranda, R., Aznar, M., Carrascosa, J. L., Schaap, I. A., Reguera, D. and de Pablo, P. J. (2012) 'Direct measurement of phage phi29 stiffness provides evidence of internal pressure', *Small* 8(15): 2366-70.
- Hernando-Perez, M., Pascual, E., Aznar, M., Ionel, A., Caston, J. R., Luque, A., Carrascosa, J. L., Reguera, D. and de Pablo, P. J. (2014b) 'The interplay between mechanics and stability of viral cages', *Nanoscale* 6(5): 2702-9.
- Hernando, E. (1999) El transporte nuclear de las proteínas de la cápsida del parvovirus MVM está regulado por el ciclo celular. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Hernando, E., Llamas-Saiz, A. L., Foces-Foces, C., McKenna, R., Portman, I., Agbandje-McKenna, M. and Almendral, J. M. (2000) 'Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles', *Virology* 267(2): 299-309.
- Hogle, J. M. (2002) 'Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways', *Annu Review Microbiol* 56: 677-702.
- Holmes, K. C. (1979) 'Protein-RNA interactions during TMV assembly', *J Supramol Struct* 12(3): 305-20.
- Horcas, I., Fernandez, R., Gomez-Rodriguez, J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. and Baro, A. (2007) 'WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology', *Rev Sci Instrum* 78(1): 013705.
- Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) 'VMD: visual molecular dynamics', *J Mol Graph* 14(1): 33-8, 27-8.
- Ivanovska, I. L., de Pablo, P. J., Ibarra, B., Sgalari, G., MacKintosh, F. C., Carrascosa, J. L., Schmidt, C. F. and Wuite, G. J. (2004) 'Bacteriophage capsids: tough nanoshells with complex elastic properties', *Proc Natl Acad Sci USA* 101(20): 7600-5.
- Ivanovska, I. L., Miranda, R., Carrascosa, J. L., Wuite, G. J. and Schmidt, C. F. (2011) 'Discrete fracture patterns of virus shells reveal mechanical building blocks', *Proc Natl Acad Sci USA* 108(31): 12611-6.
- Ivanovska, I. L., Wuite, G., Jonsson, B. and Evilevitch, A. (2007) 'Internal DNA pressure modifies stability of WT phage', *Proc Natl Acad Sci USA* 104(23): 9603-8.
- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V. and Aravind, L. (2004) 'Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases', *J Struct Biol* 146(1-2): 11-31.

- Jagannathan, B. and Marqusee, S. (2013) 'Protein folding and unfolding under force', *Biopolymers* 99(11): 860-9.
- Johnson, J. E. (2003) 'Virus particle dynamics', *Adv Protein Chem* 64: 197-218.
- Johnson, J. E. (2010) 'Virus particle maturation: insights into elegantly programmed nanomachines', *Curr Opin Chem Biol* 20(2): 210-6.
- Johnson, J. M., Tang, J., Nyame, Y., Willits, D., Young, M. J. and Zlotnick, A. (2005) 'Regulating self-assembly of spherical oligomers', *Nano Lett* 5(4): 765-70.
- Katen, S. and Zlotnick, A. (2009) 'The thermodynamics of virus capsid assembly', *Methods Enzymol* 455: 395-417.
- Kawano, M. A., Xing, L., Tsukamoto, H., Inoue, T., Handa, H. and Cheng, R. H. (2009) 'Calcium bridge triggers capsid disassembly in the cell entry process of simian virus 40', *J Biol Chem* 284(50): 34703-12.
- Kienberger, F., Ebner, A., Gruber, H. J. and Hinterdorfer, P. (2006) 'Molecular recognition imaging and force spectroscopy of single biomolecules', *Acc Chem Res* 39(1): 29-36.
- King, J. A., Dubielzig, R., Grimm, D. and Kleinschmidt, J. A. (2001) 'DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids', *EMBO J* 20(12): 3282-91.
- Kol, N., Gladnikoff, M., Barlam, D., Shneck, R. Z., Rein, A. and Rousso, I. (2006) 'Mechanical properties of murine leukemia virus particles: effect of maturation', *Biophys J* 91(2): 767-74.
- Kol, N., Shi, Y., Tsvitov, M., Barlam, D., Shneck, R. Z., Kay, M. S. and Rousso, I. (2007) 'A stiffness switch in human immunodeficiency virus', *Biophys J* 92(5): 1777-83.
- Konecny, R., Trylska, J., Tama, F., Zhang, D., Baker, N. A., Brooks, C. L., 3rd and McCammon, J. A. (2006) 'Electrostatic properties of cowpea chlorotic mottle virus and cucumber mosaic virus capsids', *Biopolymers* 82(2): 106-20.
- Kontou, M., Govindasamy, L., Nam, H. J., Bryant, N., Llamas-Saiz, A. L., Foces-Foces, C., Hernando, E., Rubio, M. P., McKenna, R., Almendral, J. M. *et al.* (2005) 'Structural determinants of tissue tropism and in vivo pathogenicity for the parvovirus minute virus of mice', *J of Virol* 79(17): 10931-43.
- Kotterman, M. A. and Schaffer, D. V. (2014) 'Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy', *Nat Rev Genet* 15(7): 445-51.
- Kuznetsov, Y. G. and McPherson, A. (2011) 'Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells', *Microbiol Mol Biol Rev* 75(2): 268-85.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature* 227(5259): 680-5.
- Landau, L. D. and Lifshitz, E. M. (1986) *Theory of elasticity*, Boston: Butterworth-Heinemann.
- Larson, S. B., Koszelak, S., Day, J., Greenwood, A., Dodds, J. A. and McPherson, A. (1993a) 'Double-helical RNA in satellite tobacco mosaic virus', *Nature* 361(6408): 179-82.

- Larson, S. B., Koszelak, S., Day, J., Greenwood, A., Dodds, J. A. and McPherson, A. (1993b) 'Three-dimensional structure of satellite tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution', *J Mol Biol* 231(2): 375-91.
- Lata, R., Conway, J. F., Cheng, N., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Wikoff, W. R., Johnson, J. E., Tsuruta, H. and Steven, A. C. (2000) 'Maturation dynamics of a viral capsid: visualization of transitional intermediate states', *Cell* 100(2): 253-63.
- Lewis, J. K., Bothner, B., Smith, T. J. and Siuzdak, G. (1998) 'Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus', *Proc Natl Acad Sci USA* 95(12): 6774-8.
- Li, F. and Wang, Q. (2014) 'Fabrication of nanoarchitectures templated by virus-based nanoparticles: strategies and applications', *Small* 10(2): 230-45.
- Li, Q., Yafal, A. G., Lee, Y. M., Hogle, J. and Chow, M. (1994) 'Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature', *J Virol* 68(6): 3965-70.
- Liashkovich, I., Hafezi, W., Kuhn, J. E., Oberleithner, H., Kramer, A. and Shahin, V. (2008) 'Exceptional mechanical and structural stability of HSV-1 unveiled with fluid atomic force microscopy', *J Cell Sci* 121(Pt 14): 2287-92.
- Liepold, L. O., Revis, J., Allen, M., Oltrogge, L., Young, M. and Douglas, T. (2005) 'Structural transitions in Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV)', *Phys Biol* 2(4): S166-72.
- Limn, C. K., Staeuber, N., Monastyrskaya, K., Gouet, P. and Roy, P. (2000) 'Functional dissection of the major structural protein of bluetongue virus: identification of key residues within VP7 essential for capsid assembly', *J Virol* 74(18): 8658-69.
- Linser, P. J., Trapido-Rosenthal, H. G. and Orona, E. (1997) 'Glutamine synthetase is a glial-specific marker in the olfactory regions of the lobster (*Panulirus argus*) nervous system', *Glia* 20(4): 275-83.
- Liu, Z., Qiao, J., Niu, Z. and Wang, Q. (2012) 'Natural supramolecular building blocks: from virus coat proteins to viral nanoparticles', *Chem Soc Rev* 41(18): 6178-94.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Agbandje-McKenna, M. and Almendral, J. M. (2000) 'A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly', *J Virol* 74(8): 3804-14.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Garcia, J. and Almendral, J. M. (2002) 'Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection', *J Virol* 76(14): 7049-59.
- Lopez-Bueno, A. (2002) Cambios de aminoácidos en la superficie de la cápsida del parvovirus MVM determinan la adaptación, el tropismo y el escape a anticuerpos neutralizantes, en un hospedador inmunodeficiente. Madrid: Universidad autónoma de Madrid.
- Lopez-Bueno, A., Mateu, M. G. and Almendral, J. M. (2003) 'High mutant frequency in populations of a DNA virus allows evasion from antibody therapy in an immunodeficient host', *J Virol* 77(4): 2701-8.

- Lopez-Bueno, A., Rubio, M. P., Bryant, N., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M. and Almendral, J. M. (2006) 'Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence', *J Virol* 80(3): 1563-73.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F. and Olins, P. O. (1993) 'Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*', *J Virol* 67(8): 4566-79.
- Luque, A. (2011) Structure, mechanical properties, and self-assembly of viral capsids. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Luque, A. and Reguera, D. (2010) 'The structure of elongated viral capsids', *Biophys J* 98(12): 2993-3003.
- Luque, A., Reguera, D., Morozov, A., Rudnick, J. and Bruinsma, R. (2012) 'Physics of shell assembly: line tension, hole implosion, and closure catastrophe', *J Chem Phys* 136(18): 184507.
- Llamas-Saiz, A. L., Agbandje-McKenna, M., Wikoff, W. R., Bratton, J., Tattersall, P. and Rossmann, M. G. (1997) 'Structure determination of minute virus of mice', *Acta Crystallogr Sect D-Biol Crystallogr* 53(Pt 1): 93-102.
- Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J. M., Kempf, C. and Ros, C. (2006) 'Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome', *J Virol* 80(2): 1015-24.
- Maree, F. F., Blignaut, B., de Beer, T. A. and Rieder, E. (2013) 'Analysis of SAT type foot-and-mouth disease virus capsid proteins and the identification of putative amino acid residues affecting virus stability', *PLOS One* 8(5): e61612.
- Maroto, B., Valle, N., Saffrich, R. and Almendral, J. M. (2004) 'Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface', *J Virol* 78(19): 10685-94.
- Mateo, R., Diaz, A., Baranowski, E. and Mateu, M. G. (2003) 'Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in a foot-and-mouth disease virus capsid reveals critical contributions of many side chains to particle stability and viral function', *J Biol Chem* 278(42): 41019-27.
- Mateo, R., Luna, E., Rincon, V. and Mateu, M. G. (2008) 'Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in the development of improved vaccines', *J Virol* 82(24): 12232-40.
- Mateu, M. G. (1995) 'Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view', *Virus Res* 38(1): 1-24.
- Mateu, M. G. (2009) 'The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly', *FEBS J* 276(21): 6098-109.
- Mateu, M. G. (2012) 'Mechanical properties of viruses analyzed by atomic force microscopy: a virological perspective', *Virus Res* 168(1-2): 1-22.
- Mateu, M. G. (2013a) 'Assembly, stability and dynamics of virus capsids', *Arch Biochem Biophys* 531(1-2): 65-79.

- Mateu, M. G. (2013b) The Structural Basis of Virus Function. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.). Dordrecht, The Netherlands.: Springer.
- Mateu, M. G. (2013c) *Structure and Physics of Viruses*: Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Mateu, M. G. and Verdaguer, N. (2004) Functional and structural aspects of the interaction of foot-and-mouth disease virus with antibodies. en *Foot-and-Mouth Disease. Current perspectives*. F. Sobrino and E. Domingo (eds.). Wymondham, UK: Horizon Bioscience.
- McKenna, R., Xia, D., Willingmann, P., Ilag, L. L., Krishnaswamy, S., Rossmann, M. G., Olson, N. H., Baker, T. S. and Incardona, N. L. (1992) 'Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage phi X174 and its functional implications', *Nature* 355(6356): 137-43.
- Meloen, R. H., Rowlands, D. J. and Brown, F. (1979) 'Comparison of the antibodies elicited by the individual structural polypeptides of foot-and mouth disease and polio viruses', *J Gen Virol* 45(3): 761-3.
- Menéndez-Arias, L. (2013) Antiviral Agents: Structural Basis of Action and Rational Design. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.). Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Merchinsky, M. J., Tattersall, P. J., Leary, J. J., Cotmore, S. F., Gardiner, E. M. and Ward, D. C. (1983) 'Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice', *J Virol* 47(1): 227-32.
- Meyer, G. and Amer, N. M. (1988) 'Novel optical approach to atomic force microscopy', *Appl Phys Lett* 53(12): 1045-1047.
- Michel, J. P., Ivanovska, I. L., Gibbons, M. M., Klug, W. S., Knobler, C. M., Wuite, G. J. and Schmidt, C. F. (2006) 'Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength', *Proc Natl Acad Sci USA* 103(16): 6184-9.
- Moisant, P., Neeman, H. and Zlotnick, A. (2010) 'Exploring the paths of (virus) assembly', *Biophys J* 99(5): 1350-7.
- Morini, G., Bassoli, A. and Temussi, P. A. (2005) 'From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor', *J Med Chem* 48(17): 5520-9.
- Morton, V. L., Stockley, P. G., Stonehouse, N. J. and Ashcroft, A. E. (2008) 'Insights into virus capsid assembly from non-covalent mass spectrometry', *Mass Spectrom Rev* 27(6): 575-95.
- Murray, C. L., Jones, C. T., Tassello, J. and Rice, C. M. (2007) 'Alanine scanning of the hepatitis C virus core protein reveals numerous residues essential for production of infectious virus', *J Virol* 81(19): 10220-31.
- Nakano, M. Y., Boucke, K., Suomalainen, M., Stidwill, R. P. and Greber, U. F. (2000) 'The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol', *J Virol* 74(15): 7085-95.

- Nam, K. T., Kim, D. W., Yoo, P. J., Chiang, C. Y., Meethong, N., Hammond, P. T., Chiang, Y. M. and Belcher, A. M. (2006) 'Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes', *Science* 312(5775): 885-8.
- Neira, J. L. (2009) 'The capsid protein of human immunodeficiency virus: designing inhibitors of capsid assembly', *FEBS J* 276(21): 6110-7.
- Nguyen, H. D., Reddy, V. S. and Brooks, C. L., 3rd (2009) 'Invariant polymorphism in virus capsid assembly', *J Am Chem Soc* 131(7): 2606-14.
- Ni, P., Wang, Z., Ma, X., Das, N. C., Sokol, P., Chiu, W., Dragnea, B., Hagan, M. and Kao, C. C. (2012) 'An examination of the electrostatic interactions between the N-terminal tail of the Brome Mosaic Virus coat protein and encapsidated RNAs', *J Mol Biol* 419(5): 284-300.
- Oberhauser, A. F. and Carrion-Vazquez, M. (2008) 'Mechanical biochemistry of proteins one molecule at a time', *J Biol Chem* 283(11): 6617-21.
- Oliveira, A. C., Ishimaru, D., Goncalves, R. B., Smith, T. J., Mason, P., Sa-Carvalho, D. and Silva, J. L. (1999) 'Low temperature and pressure stability of picornaviruses: implications for virus uncoating', *Biophys J* 76(3): 1270-9.
- Ortega-Esteban, A., Perez-Berna, A. J., Menendez-Conejero, R., Flint, S. J., San Martin, C. and de Pablo, P. J. (2013) 'Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue', *Sci Rep* 3: 1434.
- P.J. Jardine, D. A. (2006) DNA packaging in double-stranded DNA bacteriophages. in R. Calendar (ed.) *The Bacteriophages*. Oxford: Oxford Press.
- Pawlica, P. and Berthoux, L. (2014) 'Cytoplasmic dynein promotes HIV-1 uncoating', *Viruses* 6(11): 4195-211.
- Perez-Berna, A. J., Ortega-Esteban, A., Menendez-Conejero, R., Winkler, D. C., Menendez, M., Steven, A. C., Flint, S. J., de Pablo, P. J. and San Martin, C. (2012) 'The role of capsid maturation on adenovirus priming for sequential uncoating', *J Biol Chem* 287(37): 31582-95.
- Perez, R., Castellanos, M., Rodriguez-Huete, A. and Mateu, M. G. (2011) 'Molecular determinants of self-association and rearrangement of a trimeric intermediate during the assembly of a parvovirus capsid', *J Mol Biol* 413(1): 32-40.
- Petrov, A. S., Lim-Hing, K. and Harvey, S. C. (2007) 'Packaging of DNA by bacteriophage epsilon15: structure, forces, and thermodynamics', *Structure* 15(7): 807-12.
- Phelps, D. K., Speelman, B. and Post, C. B. (2000) 'Theoretical studies of viral capsid proteins', *Curr Opin Struct Biol* 10(2): 170-3.
- Pierson, E. E., Keifer, D. Z., Selzer, L., Lee, L. S., Contino, N. C., Wang, J. C., Zlotnick, A. and Jarrold, M. F. (2014) 'Detection of late intermediates in virus capsid assembly by charge detection mass spectrometry', *J Am Chem Soc* 136(9): 3536-41.
- Plevka, P., Hafenstein, S., Li, L., D'Abbramo, A., Jr., Cotmore, S. F., Rossmann, M. G. and Tattersall, P. (2011) 'Structure of a packaging-defective mutant of minute virus of mice indicates that the genome is packaged via a pore at a 5-fold axis', *J Virol* 85(10): 4822-7.

- Polisky, B. and McCarthy, B. (1975) 'Location of histones on simian virus 40 DNA', *Proc Natl Acad Sci USA* 72(8): 2895-9.
- Prevelige, P. E., Jr. (2011) 'New approaches for antiviral targeting of HIV assembly', *J Mol Biol* 410(4): 634-40.
- Puntener, D., Engelke, M. F., Ruzsics, Z., Strunze, S., Wilhelm, C. and Greber, U. F. (2011) 'Stepwise loss of fluorescent core protein V from human adenovirus during entry into cells', *J Virol* 85(1): 481-96.
- Ramirez, J. C., Fairen, A. and Almendral, J. M. (1996) 'Parvovirus minute virus of mice strain i multiplication and pathogenesis in the newborn mouse brain are restricted to proliferative areas and to migratory cerebellar young neurons', *J Virol* 70(11): 8109-16.
- Ramirez, J. C., Santaren, J. F. and Almendral, J. M. (1995) 'Transcriptional inhibition of the parvovirus minute virus of mice by constitutive expression of an antisense RNA targeted against the NS-1 transactivator protein', *Virology* 206(1): 57-68.
- Rapaport, D. C. (2008) 'Role of reversibility in viral capsid growth: a paradigm for self-assembly', *Phys Rev Lett* 101(18): 186101.
- Rapaport, D. C. (2010) 'Studies of reversible capsid shell growth', *J Phys Condens Matter* 22(10): 104115.
- Reddy, V. S., Giesing, H. A., Morton, R. T., Kumar, A., Post, C. B., Brooks, C. L., 3rd and Johnson, J. E. (1998) 'Energetics of quasiequivalence: computational analysis of protein-protein interactions in icosahedral viruses', *Biophys J* 74(1): 546-58.
- Reddy, V. S. and Johnson, J. E. (2005) 'Structure-derived insights into virus assembly', *Adv Virus Res* 64: 45-68.
- Reguera, D. (2013) Theoretical Studies on Assembly, Physical Stability and Dynamics of Viruses. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.) Springer. Dordrecht, The Netherlands
- Reguera, J., Carreira, A., Riobos, L., Almendral, J. M. and Mateu, M. G. (2004) 'Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid', *Proc Natl Acad Sci USA* 101(9): 2724-9.
- Reguera, J., Grueso, E., Carreira, A., Sanchez-Martinez, C., Almendral, J. M. and Mateu, M. G. (2005) 'Functional relevance of amino acid residues involved in interactions with ordered nucleic acid in a spherical virus', *J Biol Chem* 280(18): 17969-77.
- Reisdorph, N., Thomas, J. J., Katpally, U., Chase, E., Harris, K., Siuzdak, G. and Smith, T. J. (2003) 'Human rhinovirus capsid dynamics is controlled by canyon flexibility', *Virology* 314(1): 34-44.
- Richards, R., Linser, P. and Armentrout, R. W. (1977) 'Kinetics of assembly of a parvovirus, minute virus of mice, in synchronized rat brain cells', *J Virol* 22(3): 778-93.
- Rincon, V. (2012) Relaciones estructura-función en la capsida del virus de la fiebre aftosa: algunas implicaciones para el desarrollo de vacunas y antivirales. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid

- Rincon, V., Rodriguez-Huete, A., Lopez-Arguello, S., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M., Harmsen, M. M. and Mateu, M. G. (2014) 'Identification of the Structural Basis of Thermal Lability of a Virus Provides a Rationale for Improved Vaccines', *Structure*.
- Riolobos, L., Reguera, J., Mateu, M. G. and Almendral, J. M. (2006) 'Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid', *J Mol Biol* 357(3): 1026-38.
- Roos, W. H., Gertsman, I., May, E. R., Brooks, C. L., 3rd, Johnson, J. E. and Wuite, G. J. (2012) 'Mechanics of bacteriophage maturation', *Proc Natl Acad Sci USA* 109(7): 2342-7.
- Roos, W. H., Radtke, K., Kniesmeijer, E., Geertsema, H., Sodeik, B. and Wuite, G. J. (2009) 'Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids', *Proc Natl Acad Sci USA* 106(24): 9673-8.
- Ros, C., Baltzer, C., Mani, B. and Kempf, C. (2006) 'Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability', *Virology* 345(1): 137-47.
- Rossmann, M., Greve, J., Kolatkar, P., Olson, N., Smith, T., McKinlay, M. and Rueckert, R. (1997) 'Rhinovirus attachment and cell entry', en *Structural biology of viruses*. W. Chiu R. M. Burnett and R. L. Garcea (eds.) Oxford University Press, New York, NY: 105-133.
- Rossmann, M. G. and Johnson, J. E. (1989) 'Icosahedral RNA virus structure', *Annu Rev Biochem* 58: 533-73.
- Rubio, M. P., Guerra, S. and Almendral, J. M. (2001) 'Genome replication and postencapsidation functions mapping to the nonstructural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells', *J Virol* 75(23): 11573-82.
- Rueckert, R. R. (1996) Picornaviridae: the viruses and their replication. in D. M. Fields D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.) *Virology*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.
- Ruigrok, R. W., Crepin, T. and Kolakofsky, D. (2011) 'Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses', *Curr Opin Microbiol* 14(4): 504-10.
- Sader, J. E., Chon, J. W. and Mulvaney, P. (1999) 'Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers', *Rev Sci Instrum* 70(10): 3967-3969.
- Sae-Ueng, U., Liu, T., Catalano, C. E., Huffman, J. B., Homa, F. L. and Evilevitch, A. (2014) 'Major capsid reinforcement by a minor protein in herpesviruses and phage', *Nucleic Acids Res* 42(14): 9096-107.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York.
- San Martin, C. (2012) 'Latest insights on adenovirus structure and assembly', *Viruses* 4(5): 847-77.
- San Martin, C. (2013) Structure and Assembly of Complex Viruses. en *Structure and Physics of Viruses*. M. G. Mateu (ed.) Springer. Dordrecht, The Netherlands.

- Sanchez-Martinez, C., Grueso, E., Carroll, M., Rommelaere, J. and Almendral, J. M. (2012) 'Essential role of the unordered VP2 n-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry', *Virology* 432(1): 45-56.
- Santaren, J. F., Ramirez, J. C. and Almendral, J. M. (1993) 'Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis', *J Virol* 67(9): 5126-38.
- Sayle, R. A. and Milner-White, E. J. (1995) 'RASMOL: biomolecular graphics for all', *Trends Biochem Sci* 20(9): 374.
- Schaap, I. A., Carrasco, C., de Pablo, P. J., MacKintosh, F. C. and Schmidt, C. F. (2006) 'Elastic response, buckling, and instability of microtubules under radial indentation', *Biophys J* 91(4): 1521-31.
- Segovia, J. C., Bueren, J. A. and Almendral, J. M. (1995) 'Myeloid depression follows infection of susceptible newborn mice with the parvovirus minute virus of mice (strain i)', *J Virol* 69(5): 3229-32.
- Segovia, J. C., Gallego, J. M., Bueren, J. A. and Almendral, J. M. (1999) 'Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minute virus of mice', *J Virol* 73(3): 1774-84.
- Segovia, J. C., Real, A., Bueren, J. A. and Almendral, J. M. (1991) 'In vitro myelosuppressive effects of the parvovirus minute virus of mice (MVMi) on hematopoietic stem and committed progenitor cells', *Blood* 77(5): 980-8.
- Seifert, C. and Grater, F. (2013) 'Protein mechanics: how force regulates molecular function', *Biochim Biophys Acta* 1830(10): 4762-8.
- Singh, S. and Zlotnick, A. (2003) 'Observed hysteresis of virus capsid disassembly is implicit in kinetic models of assembly', *J Biol Chem* 278(20): 18249-55.
- Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., Anderson, D. L. and Bustamante, C. (2001) 'The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force', *Nature* 413(6857): 748-52.
- Smith, T. J., Kremer, M. J., Luo, M., Vriend, G., Arnold, E., Kamer, G., Rossmann, M. G., McKinlay, M. A., Diana, G. D. and Otto, M. J. (1986) 'The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating', *Science* 233(4770): 1286-93.
- Smyth, M. S. and Martin, J. H. (2002) 'Picornavirus uncoating', *Mol Pathol* 55(4): 214-9.
- Spalholz, B. A. and Tattersall, P. (1983) 'Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors', *J Virol* 46(3): 937-43.
- Speir, J. A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S. and Johnson, J. E. (1995) 'Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy', *Structure* 3(1): 63-78.
- Steven, A. C., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L. and Conway, J. F. (2005) 'Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity', *Curr Opin Struct Biol* 15(2): 227-36.

- Stonehouse, N. J., Scott, D. J., Fonseca, S., Murray, J., Adams, C., Clarke, A. R., Valegard, K., Golmohammadi, R., van den Worm, S., Liljas, L. *et al.* (1996) 'Molecular interactions in the RNA bacteriophage MS2', *Biochem Soc Trans* 24(3): 412.
- Stonehouse, N. J., Valegard, K., Golmohammadi, R., van den Worm, S., Walton, C., Stockley, P. G. and Liljas, L. (1996) 'Crystal structures of MS2 capsids with mutations in the subunit FG loop', *J Mol Biol* 256(2): 330-9.
- Stubbs, G. (1999) 'Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1383): 551-7.
- Sundquist, W. I. and Krausslich, H. G. (2012) 'HIV-1 assembly, budding, and maturation', *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(7): 006924.
- Sung, M. T., Cao, T. M., Coleman, R. T. and Budelier, K. A. (1983) 'Gene and protein sequences of adenovirus protein VII, a hybrid basic chromosomal protein', *Proc Natl Acad Sci USA* 80(10): 2902-6.
- Suomalainen, M. and Greber, U. F. (2013) 'Uncoating of non-enveloped viruses', *Curr Opin Virol* 3(1): 27-33.
- Tabor, C. W. and Tabor, H. (1984) 'Polyamines', *Annu Rev Biochem* 53: 749-90.
- Tan, Z., Maguire, M. L., Loeb, D. D. and Zlotnick, A. (2013) 'Genetically altering the thermodynamics and kinetics of hepatitis B virus capsid assembly has profound effects on virus replication in cell culture', *J Virol* 87(6): 3208-16.
- Tan, Z., Pionek, K., Unchwaniwala, N., Maguire, M. L., Loeb, D. D. and Zlotnick, A. (2015) 'The interface between HBV capsid proteins affects self-assembly, pgRNA packaging, and reverse transcription', *J Virol*.
- Tao Hu, R. Z., B.I. Shklovskii (2008) 'Electrostatic theory of viral self-assembly', *Physica A* 387(12): 3059-3064.
- Tattersall, P. and Bratton, J. (1983) 'Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice', *J Virol* 46(3): 944-55.
- Tattersall, P. and Cotmore, S. F. (1988) The nature of parvoviruses. en *Parvoviruses and human disease*. J. R. Pattison (ed.) FL: CRC Press. Boca Raton.
- Temussi, P. A. (2006) 'Natural sweet macromolecules: how sweet proteins work', *Cell Mol Life Sci* 63(16): 1876-88.
- Tijssen, P., Szelei, J. and Zadori, Z. (2006) Phospholipase A2 domains in structural proteins of parvoviruses. en *Parvoviruses*. J. K. Kerr M. E. Cotmore R. M. Bloom C. R. Linden and C. R. Parrish (eds.) Arnold. New York.
- Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., Compans, R. W. *et al.* (1991) 'The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications', *Science* 251(5000): 1456-64.
- Tullis, G. E., Burger, L. R. and Pintel, D. J. (1992) 'The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo', *Virology* 191(2): 846-57.

- Tullis, G. E., Burger, L. R. and Pintel, D. J. (1993) 'The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity', *J Virol* 67(1): 131-41.
- Utrecht, C., Versluis, C., Watts, N. R., Roos, W. H., Wuite, G. J., Wingfield, P. T., Steven, A. C. and Heck, A. J. (2008) 'High-resolution mass spectrometry of viral assemblies: molecular composition and stability of dimorphic hepatitis B virus capsids', *Proc Natl Acad Sci USA* 105(27): 9216-20.
- Valle, N., Rioloobos, L. and Almendral, J. M. (2006) Synthesis, post-translational modification and trafficking of the parvovirus structural polypeptides. en *Parvoviruses*. J. K. Kerr M. E. Cotmore R. M. Bloom C. R. Linden and C. R. Parrish (eds.) Arnold. New York.
- Vallone, B. and Brunori, M. (2004) 'Roles for holes: are cavities in proteins mere packing defects?', *Ital J Biochem* 53(1): 46-52.
- van der Schoot, P. and Bruinsma, R. (2005) 'Electrostatics and the assembly of an RNA virus', *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 71(6 Pt 1): 061928.
- van Vlijmen, H. W., Curry, S., Schaefer, M. and Karplus, M. (1998) 'Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH', *J Mol Biol* 275(2): 295-308.
- Vaughan, R., Tragesser, B., Ni, P., Ma, X., Dragnea, B. and Kao, C. C. (2014) 'The tripartite virions of the brome mosaic virus have distinct physical properties that affect the timing of the infection process', *J Virol* 88(11): 6483-91.
- Vazquez-Calvo, A., Saiz, J. C., McCullough, K. C., Sobrino, F. and Martin-Acebes, M. A. (2012) 'Acid-dependent viral entry', *Virus Res* 167(2): 125-37.
- Veesler, D. and Johnson, J. E. (2012) 'Virus maturation', *Annu Rev Biophys* 41: 473-96.
- Ventoso, I., Berlanga, J. J. and Almendral, J. M. (2010) 'Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis', *J Virol* 84(10): 5043-51.
- von Schwedler, U. K., Stray, K. M., Garrus, J. E. and Sundquist, W. I. (2003) 'Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein', *J Virol* 77(9): 5439-50.
- Vriend, G. (1990) 'WHAT IF: a molecular modeling and drug design program', *J Mol Graph* 8(1): 52-6, 29.
- Wells, J. A. (1991) 'Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces', *Methods Enzymol* 202: 390-411.
- Whittaker, G. R. and Helenius, A. (1998) 'Nuclear import and export of viruses and virus genomes', *Virology* 246(1): 1-23.
- Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L. and Nemerow, G. R. (2005) 'Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly', *J Virol* 79(4): 1992-2000.
- Witz, J. and Brown, F. (2001) 'Structural dynamics, an intrinsic property of viral capsids', *Arch Virol* 146(12): 2263-74.

- Xie, Q. and Chapman, M. S. (1996) 'Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution', *J Mol Biol* 264(3): 497-520.
- Yoon-Robarts, M., Blouin, A. G., Bleker, S., Kleinschmidt, J. A., Aggarwal, A. K., Escalante, C. R. and Linden, R. M. (2004) 'Residues within the B' motif are critical for DNA binding by the superfamily 3 helicase Rep40 of adeno-associated virus type 2', *J Biol Chem* 279(48): 50472-81.
- Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M. C., Li, Y., Gariepy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R. and Tijssen, P. (2001) 'A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity', *Dev Cell* 1(2): 291-302.
- Zandi, R., Reguera, D., Bruinsma, R. F., Gelbart, W. M. and Rudnick, J. (2004) 'Origin of icosahedral symmetry in viruses', *Proc Natl Acad Sci USA* 101(44): 15556-60.
- Zandi, R., van der Schoot, P., Reguera, D., Kegel, W. and Reiss, H. (2006) 'Classical nucleation theory of virus capsids', *Biophys J* 90(6): 1939-48.
- Zhou, S. and Standring, D. N. (1992) 'Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors', *Proc Natl Acad Sci USA* 89(21): 10046-50.
- Zlotnick, A. (2005) 'Theoretical aspects of virus capsid assembly', *J Mol Recognit* 18(6): 479-90.
- Zlotnick, A., Aldrich, R., Johnson, J. M., Ceres, P. and Young, M. J. (2000) 'Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus', *Virology* 277(2): 450-6.
- Zlotnick, A. and Fane, B. A. (2011) Mechanism of Icosahedral Virus Assembly. en *Structural Virology*. M. Agbandje-McKenna and R. McKenna (eds.): RCS Publishing. Cambridge, UK.
- Zlotnick, A. and Mukhopadhyay, S. (2011) 'Virus assembly, allostery and antivirals', *Trends Microbiol* 19(1): 14-23.